

RAPPORT D'ACTIVITÉ du CEEMAT
sur le projet intitulé :

AMÉLIORATIONS DES MÉCANISMES DE DÉTOXICATION
DU MANIOC LORS DES PHASES DE FERMENTATION

(Décision MRES N° 88.L.0215)

novembre 1990

Michel Jory

chargé de recherches

CEEMAT/CIRAD

Division Génie et Technologie

Alimentaires

I- Présentation

I-1 Contexte général

Le **CEEMAT/CIRAD**, en lien avec un industriel: le **SARL Gauthier**, et un partenaire en régions chaudes : l'**Institut National des Plantes à Tubercules (INPT)** à Lomé (TOGO), mène des investigations sur la mécanisation de la fabrication du gari.

Le gari est une semoule de manioc fermentée, partiellement gélatinisée, et déshydratée. Les différentes opérations unitaires intervenant dans le procédé sont : Lavage, Epluchage, Râpage, Fermentation, Pressage, Emiettage, Défibrage, Cuisson/Séchage.

Une ligne de transformation mécanisée est en cours d'expérimentation au Togo mais l'opération de fermentation est conduite de manière traditionnelle. Cette opération est, en fait, essentielle pour l'obtention des goûts et des arômes caractéristiques du gari (fermentation lactique naturelle) et pour la détoxification du manioc. En effet, le manioc présente une certaine toxicité dans la mesure où ses tissus contiennent des composés cyanogénétiques qui sont des précurseurs d'acide cyanhydrique.

Ce problème de toxicité du manioc reste entier puisque les taux d'acide cyanhydrique, observés dans les produits dérivés du manioc, sont loin d'être négligeables, et implique la consommation du manioc parmi les causes de nombreuses maladies tropicales : neuropathie ataxique, crétinisme, goître, démyélinisation du nerf optique, pancréatite calcifiante [Sykes, A.H.; 1981]

L'**ENSA** de Montpellier a, par ailleurs, isolé une bactérie présentant une remarquable résistance au cyanure. L'étude de cette souche a révélé qu'elle était capable, grâce à plusieurs systèmes enzymatiques, de dégrader les différents composés cyanés du manioc et d'en utiliser l'azote pour sa propre croissance.

I-2 Objectifs

L'objectif recherché est la mise au point d'un processus de fermentation, qui nécessitera très vraisemblablement un fermenteur s'intégrant dans la ligne de fabrication de gari, et permettant :

- d'obtenir les goûts et arômes caractéristiques du produit fini, qui varient sensiblement suivant les zones géographiques et suivant les ethnies.
- d'assurer des taux résiduels de cyanures très faibles dans le produit fini, garantissant l'inocuité pour le consommateur et la satisfaction de la norme africaine (en projet) fixant la teneur maximum en cyanures totaux à 2 ppm

I-3 Partenaires

- **CEEMAT/CIRAD** (Centre d'Etude et d'Expérimentation en Mécanisation Agricole et Technologie Alimentaire / département du Centre de Coopération Internationale en Recherche Agronomique pour le Développement), Division Génie et Technologie Alimentaires
- **ENSA-M** (Ecole Nationale Supérieure d'Agronomie - Montpellier), chaire de microbiologie industrielle et de génétique des microorganismes
- **INPT** (Institut National des Plantes à Tubercules), Programme manioc (TOGO)
- **S.A.R.L. Gauthier** (FRANCE)

I-4 Programme général des travaux

- **Analyse technologique du procédé traditionnel (CEEMAT, INPT)**
 - * influence de la fermentation sur la qualité du produit fini
 - * influence des traitements technologiques, et en particulier de la fermentation, sur l'élimination des composés cyanogénétiques
- **Etude des possibilités de détoxication par une souche bactérienne exogène (ENSAM, CEEMAT)**
 - * étude des systèmes enzymatiques de Brevibacterium sp. R312
 - * amélioration des activités enzymatiques de cette souche
 - * recherche des possibilités de transfert des systèmes enzymatiques de Brevibacterium sp. R312 à une souche de Lactobacillus
- **Recherche d'une optimisation du procédé naturel de détoxication (CEEMAT)**
 - * observation de l'influence de la maîtrise du pH de la pulpe de manioc, de son aération et du drainage des jus d'égouttage, sur la cinétique de fermentation/détoxication
 - * définition des équipements nécessaires et d'un protocole de conduite de la fermentation
- **Transfert du procédé (CEEMAT, INPT, Gauthier)**
 - * réalisation des équipements
 - * mise en place d'un protocole de contrôle de la qualité en cours de fabrication et sur le produit fini
 - * promotion commerciale du gari "détoxiqué"

Source [JORY M. (1987)]

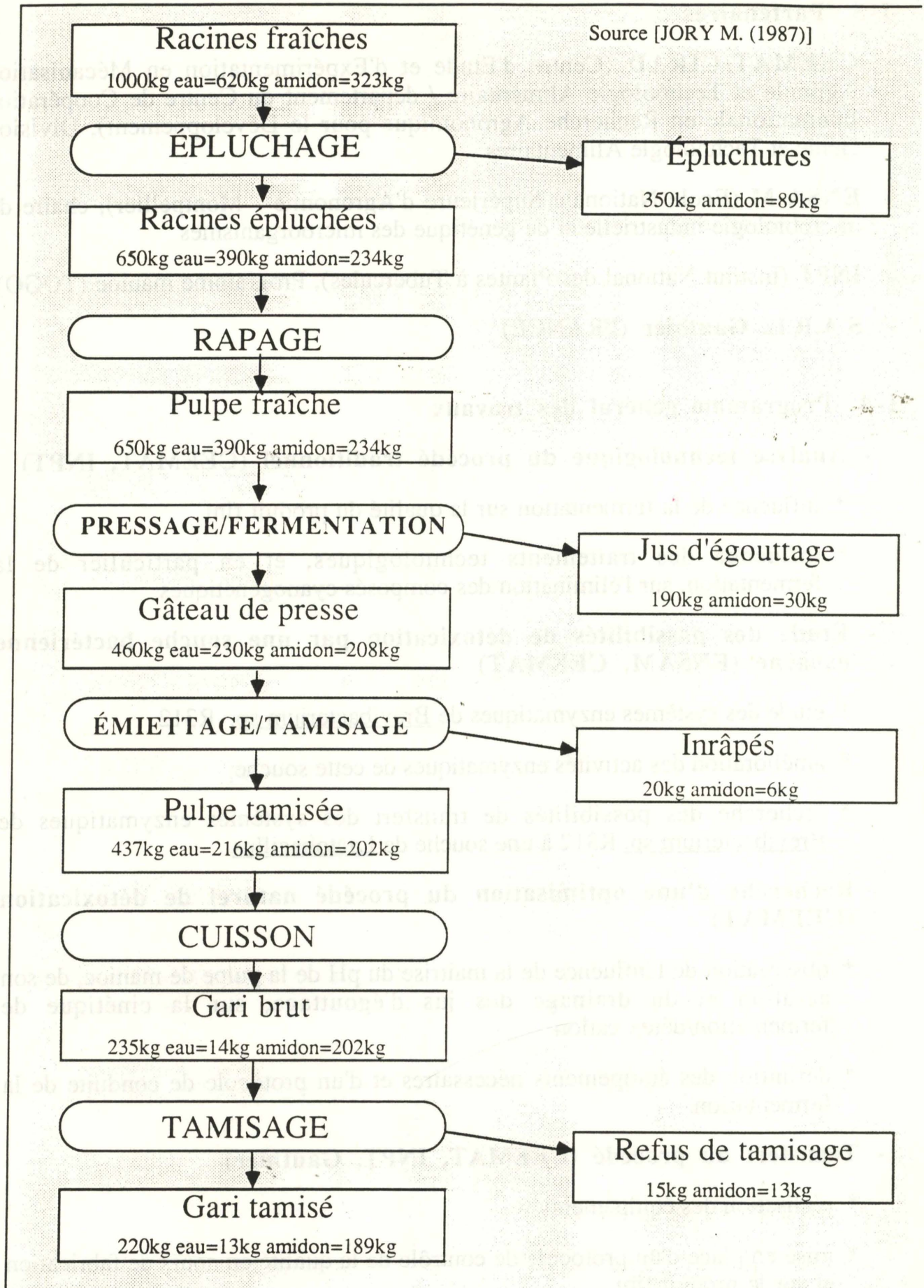


Figure 1 : flow sheet de la fabrication du gari (source Jory, M.;1987)

II- Rappel des résultats antérieurs

II-1 Observation du procédé traditionnel (Voir Fig. 1)

Les racines de manioc doivent tout d'abord être épluchées afin d'éliminer les écorces externe et interne. Cet opération, si elle s'accompagne d'une perte d'amidon, permet de réduire considérablement les teneurs en cyanures et en fibres du produit fini, et améliore notablement la durée de vie de l'outil de râpage.

Lorsque les racines ont été épluchées à la main, un rinçage à l'eau s'impose pour éliminer les traces de terre. Le manioc peut ensuite être râpé, soit à la main sur un morceau de tôle perforée présentant des bavures, soit dans une râpe mécanique.

La pulpe obtenue est traditionnellement mise dans des sacs en toile de jute et immédiatement essorée par pressage. La pression est maintenue pendant plusieurs jours pendant lesquels la pulpe subit simultanément une fermentation spontanée. Cette fermentation varie entre 2 et 5 jours suivant l'acidité recherchée. La charge de pierres ou de bûches de bois qui est disposée sur les sacs est calculée empiriquement pour qu'au terme de la durée requise de fermentation, l'essorage ait permis d'atteindre environ 50% d'humidité, valeur optimale pour la cuisson. Les jus d'égouttage peuvent être récupérés pour produire du tapioca à partir de l'amidon décanté.

Après ce pressage, le gâteau de presse doit être émietté et tamisé. Ces deux opérations sont traditionnellement réalisées simultanément en frottant, à la main, le gâteau de presse sur un tamis. L'utilisation d'une machine similaire à la râpe mécanique pour exécuter la re-fragmentation du gâteau de presse impose une opération distincte de tamisage sur un tamis vibrant afin d'éliminer les très longues fibres et les fragments de racines intrâpés.

L'opération de cuisson est réalisée dans des canaris en terre cuite, d'environ 80 cm de diamètre sur 15 cm de profondeur, disposés sur un feu de bois. Jusqu'à aujourd'hui, aucun système mécanique n'est parvenu à remplacer parfaitement le tour de main des opératrices traditionnelles. En effet, aux phénomènes physiques qui doivent intervenir dans chaque grain de la pulpe (transfert de chaleur, gélatinisation de l'amidon, séchage, "toastage"), se conjuguent des phénomènes macroscopiques de formation de grumeaux et de modification des propriétés rhéologiques de la pulpe. Cependant, les derniers résultats des observations de ces phénomènes devraient permettre de mécaniser prochainement cette opération.

Le gari obtenu est généralement tamisé de manière à éliminer les rares grumeaux qui ont échappé à la vigilance de l'opératrice pendant la cuisson. Le produit fini présente une teneur en eau de l'ordre de 10% bh, ce qui lui confère une très grande aptitude à la conservation. L'amidon est gélatinisé à environ 70% et les cyanures résiduels sont aux alentours de 15 µg/g. Cependant, ces valeurs moyennes s'accompagnent d'une très large dispersion puisque les gari traditionnels rencontrés sur les marchés togolais et béninois oscillent entre 50 et 80% de taux de gélatinisation et entre 10 et 35 µg/g de cyanures [Chuzel, G.; Griffon, D.; 1987]. Un faible taux de gélatinisation rend le gari moins digeste sans qu'une corrélation n'ait pu être mise en évidence avec l'acceptabilité organoleptique du produit. Les fortes valeurs de cyanures résiduels font craindre des intoxications graves puisque la consommation de gari au cours d'un repas atteint couramment 150 g et correspond alors à environ 5 mg de cyanure soit 10% de la dose létale (50 à 60 mg pour un adulte).

fermentation et pressage simultanés

fermentation et pressage dissociés

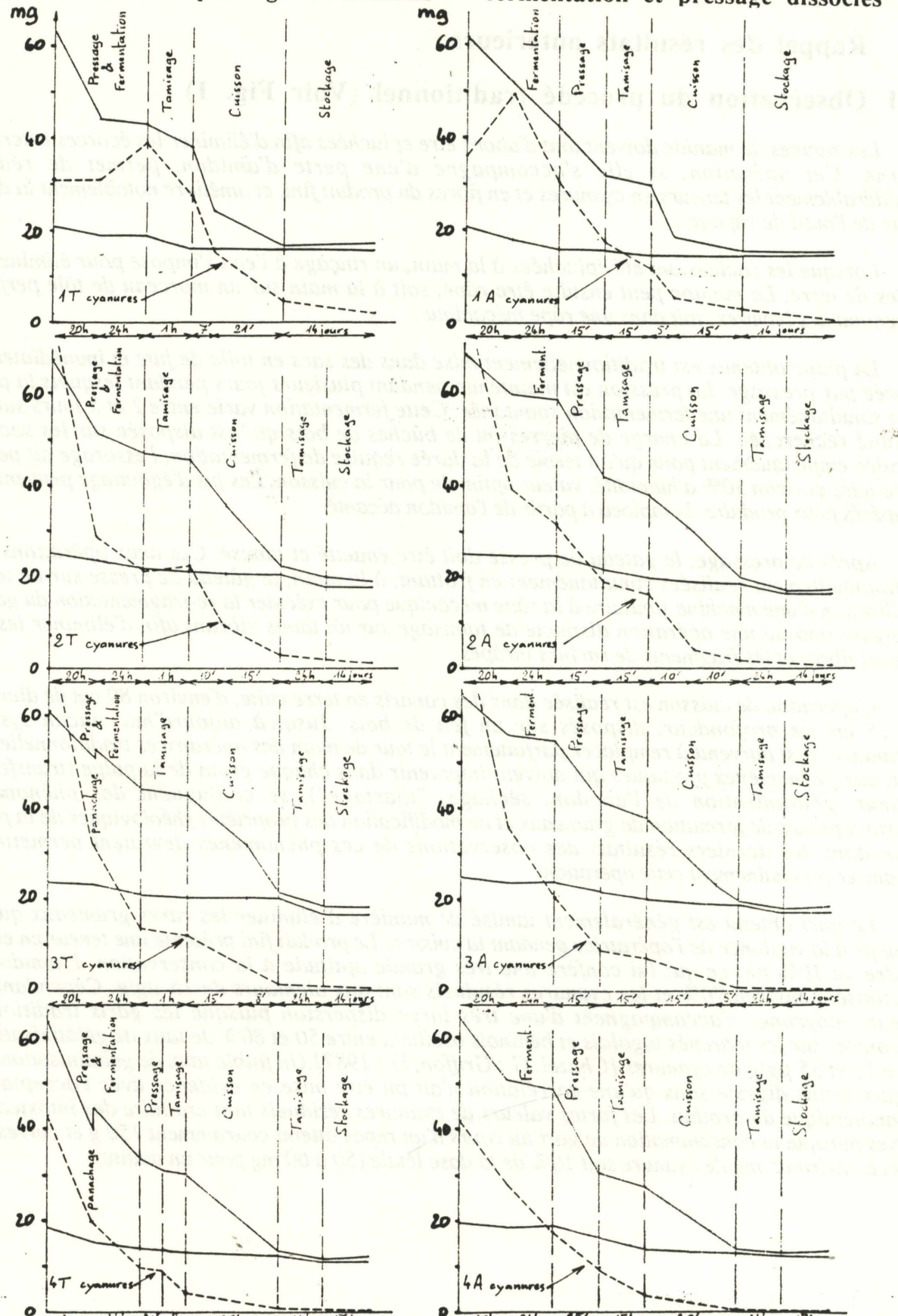
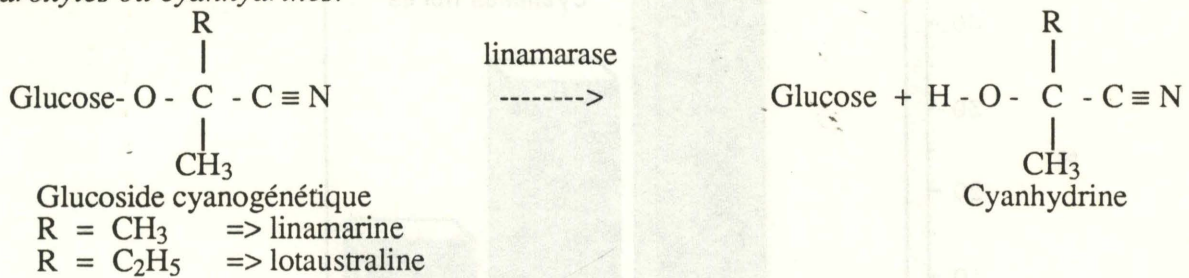


Figure 2 : observation de la dégradation des cyanures totaux lors de 8 traitements de 100 kg de manioc (Source [Jory, M. (1987)])

Les deux lignes en trait continu montrent respectivement l'évolution de la matière totale et de la matière sèche (en kg)

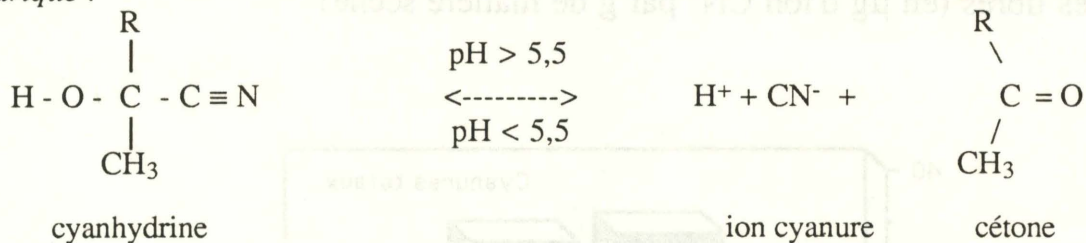
II-2 Processus naturel de détoxication

La toxicité du manioc provient de deux cyanoglucosides : la linamarine et la lotaustraline, dont les proportions habituelles sont respectivement 96% et 4% [Butler (1965)]. Ces glucosides cyanogénétiques sont présents dans le cytoplasme des cellules. Les noyaux des cellules renferment par contre une enzyme, la linamarase, capable de dégrader ces deux glucosides en nitriles α -hydroxylés ou cyanhydrines.



Cette enzyme a un pH optimum voisin de 6,5 et se trouve totalement inhibée en dessous de 5. La température d'activité maximum est voisine de 30°C.

Les cyanhydrines formées peuvent se dégrader à leur tour pour donner des cétones et de l'acide cyanhydrique :



Cette réaction chimique est d'autant plus rapide que le pH est élevé. Elle est réversible pour un $\text{pH} < 5,5$.

Si le pH est ensuite abaissé aux alentours de 4,5, le cyanure subit un "recul d'ionisation" et prend une forme moléculaire : HCN. Sous cette forme, l'acide cyanhydrique est particulièrement volatil.

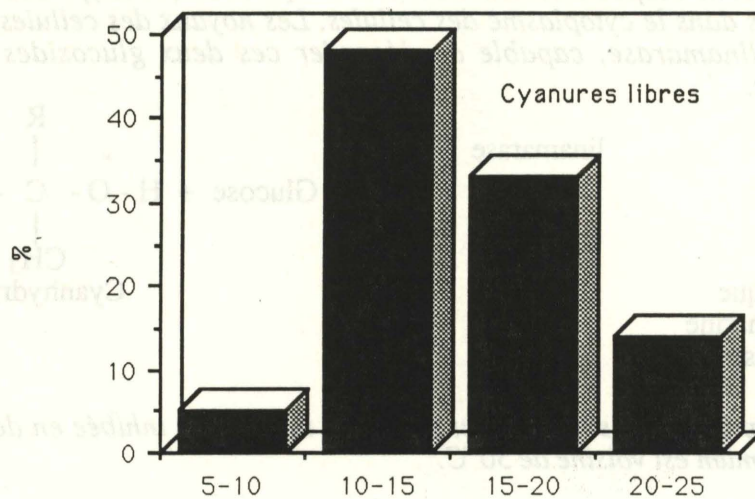
Ce processus ne parvient hélas jamais à se dérouler complètement car l'abaissement du pH, dès les premières heures qui suivent le râpage, inhibe l'enzyme endogène. Les cyanhydrines formées sont alors stables de même que les cyanoglucosides résiduels. Les ions cyanures libérés ont, par contre, tendance à former de l'acide cyanhydrique qui sera très facile à éliminer lors du pressage et lors de la cuisson. Il est vraisemblable que l'élimination du cyanure au cours de la cuisson réamorce la seconde réaction et dégrade une partie des cyanhydrines résiduelles mais, du fait du pH très bas (voisin de 3,5), l'importance de ce phénomène ne peut être que très faible.

Certaines observations ont pu être faites dans l'unité expérimentale de Davié (Togo) sur 4 lots de manioc de la même variété [Jory, M.; 1987] et par deux variantes du procédé traditionnel. Les analyses étaient réalisées dans un laboratoire situé à Lomé, après transport rapide des échantillons en glacière réfrigérée. Ces observations permettent d'appréhender le processus de détoxication au cours de la fermentation traditionnelle (voir Fig. 2).

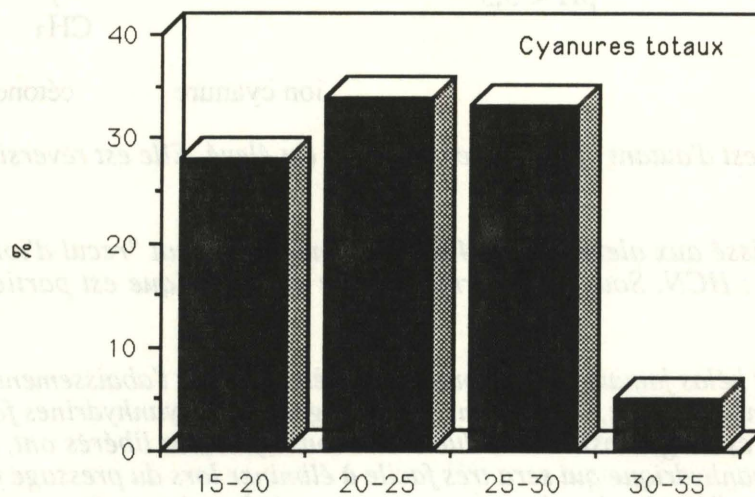
Deux expérimentations, conduites au CEEMAT à Montpellier dans un fermenteur pilote d'environ 15 litres, ont permis de confirmer la possibilité de simuler fidèlement le procédé traditionnel et d'étudier avec davantage de précision les cinétiques de dégradation des cyanures et de formation d'acides organiques.

=> Toutes ces observations confirment l'hypothèse d'une accumulation des cyanures sous la forme de cyanhydrines. Malgré tout, cette fermentation permet de rendre éliminable par les opérations suivantes une part importante (60 à 80%) des cyanures liés initialement présents et stables dans le manioc.

II-3 Analyse de garis commercialisés sur des marchés africains



Cyanures libres (en µg d'ion CN⁻ par g de matière sèche)



Cyanures totaux (en µg d'ion CN⁻ par g de matière sèche)

Figure 3 : Fréquence de distribution des cyanures libres et totaux dans des garis togolais et béninois (source Chuzel, G.; Griffon, D.;1987).

=> Mise en évidence des taux résiduels de cyanures ne présentant pas un caractère inoffensif systématique (teneurs entre 5 et 25 ppm en cyanures libres et entre 15 et 35 ppm en cyanures totaux)

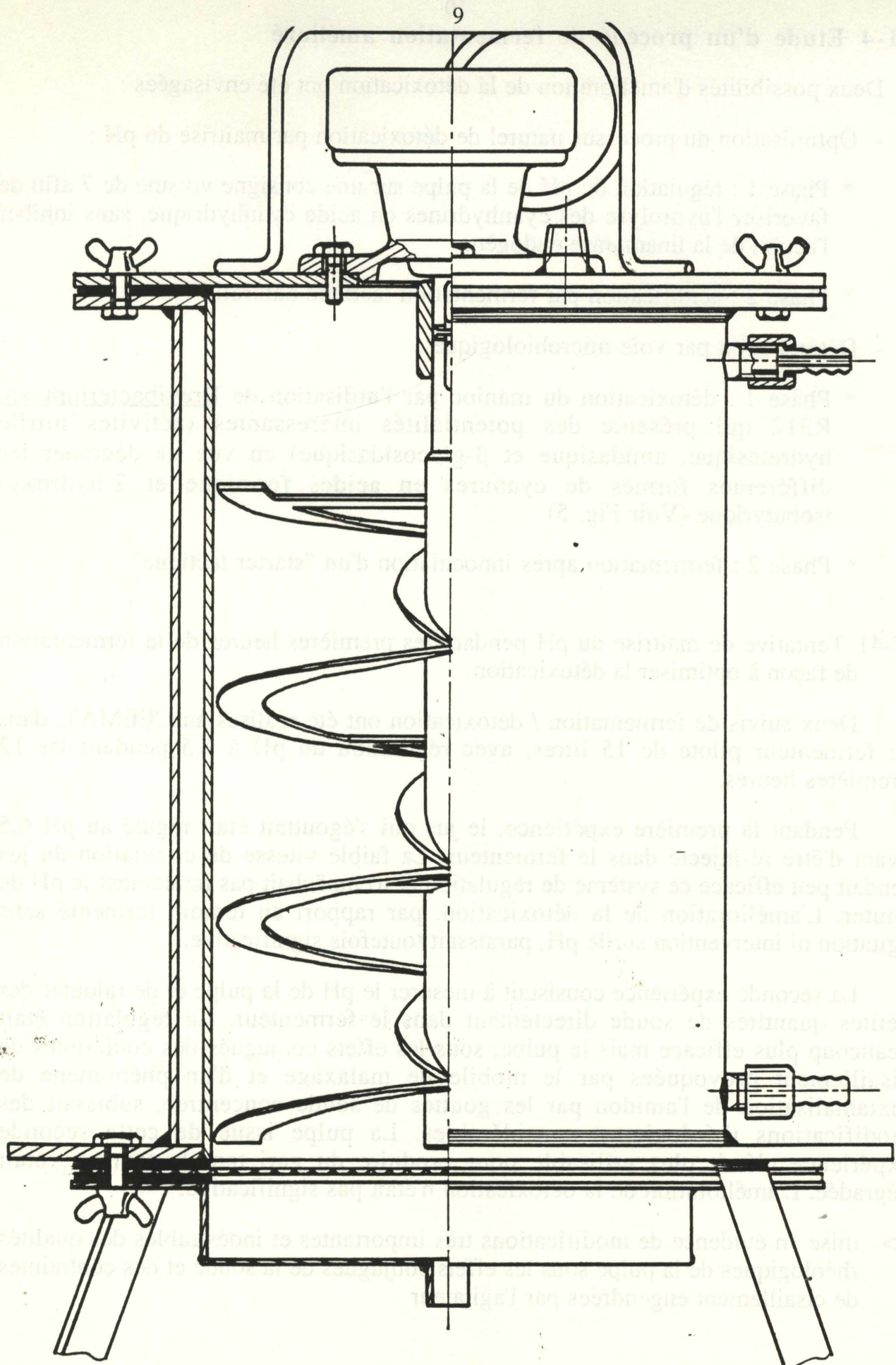


Figure 4 : schéma du fermenteur pilote vertical à mobile hélicoïdal

II-4 Etude d'un procédé de fermentation amélioré

Deux possibilités d'amélioration de la détoxication ont été envisagées :

- Optimisation du processus naturel de détoxication par maîtrise du pH :
 - * Phase 1 : régulation du pH de la pulpe sur une consigne voisine de 7 afin de favoriser l'hydrolyse des cyanhydrines en acide cyanhydrique, sans inhiber l'action de la linamarase endogène
 - * Phase 2 : acidification par fermentation lactique naturelle
- Détoxication par voie microbiologique :
 - * Phase 1 : détoxication du manioc par l'utilisation de Brevibacterium sp. R312 qui présente des potentialités intéressantes (activités nitrile hydratase, amidase et β -glucosidase) en vue de dégrader les différentes formes de cyanures en acides formique et 2-hydroxy-isobutyrique (Voir Fig. 5)
 - * Phase 2 : fermentation après inoculation d'un "starter lactique"

II-41 Tentative de maîtrise du pH pendant les premières heures de la fermentation de façon à optimiser la détoxication

Deux suivis de fermentation / détoxication ont été réalisés au CEEMAT, dans ce fermenteur pilote de 15 litres, avec régulation du pH à 6,5 pendant les 12 premières heures.

Pendant la première expérience, le jus qui s'égouttait était régulé au pH 6,5 avant d'être ré-injecté dans le fermenteur. La faible vitesse de circulation du jus rendait peu efficace ce système de régulation et n'empêchait pas totalement le pH de chuter. L'amélioration de la détoxication, par rapport au témoin fermenté sans agitation ni intervention sur le pH, paraissait toutefois significative.

La seconde expérience consistait à mesurer le pH de la pulpe et de rajouter des petites quantités de soude directement dans le fermenteur. La régulation était beaucoup plus efficace mais la pulpe, sous les effets conjugués des contraintes de cisaillement provoquées par le mobile de malaxage et d'un phénomène de nixtamalisation de l'amidon par les gouttes de soude concentrée, subissait des modifications rhéologiques considérables. La pulpe issue de cette seconde expérience n'était plus utilisable pour produire du gari tant la texture s'était dégradée. L'amélioration de la détoxication n'était pas significative.

=> mise en évidence de modifications très importantes et indésirables des qualités rhéologiques de la pulpe sous les effets conjugués de la soude et des contraintes de cisaillement engendrées par l'agitateur

II-42 Détoxification par voie microbiologique en utilisant Brevibacterium sp. R312

Aucun essai n'avait pu être réalisé sur de la pulpe de manioc dans des conditions correctes avant le présent contrat. Seules quelques expérimentations en milieu liquide fortement agité et aéré et en milieu pâteux non malaxé, avaient permis de cerner le potentiel de cette souche.

II-5 Etude de brevibacterium sp. R312

Les 3 systèmes enzymatiques de *Brevibacterium sp. R312* (β -glucosidase, nitrile hydratase et amidase) avaient été décelés. La nitrile hydratase [Arnaud, A.; 1984], [Bui et al; 1984] et l'amidase [Maestracci, M.; 1985], [Maestracci et al; 1986] avaient déjà assez bien étudiées. La β -glucosidase était encore très peu connue et apparaissait comme insuffisamment active pour "épauler" efficacement la linamarase endogène du manioc.

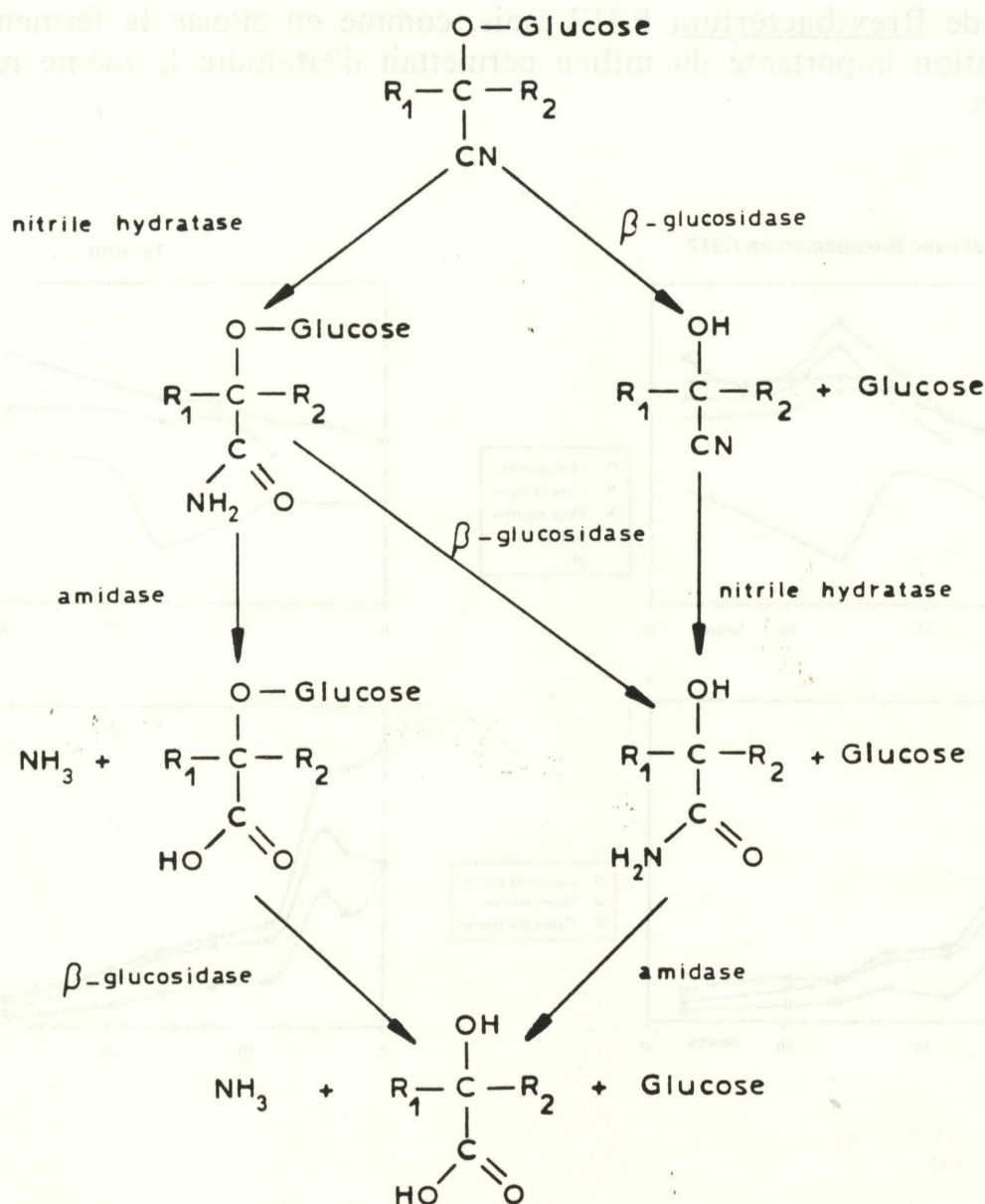


Figure 5 : Les différentes voies de dégradation des cyanoglucosides ouverts par les 3 systèmes enzymatiques de Brevibacterium sp. R312

III- Travaux réalisés dans le cadre du contrat

III-1 Etude des possibilités de détoxification par une souche bactérienne exogène (ENSAM, CEEMAT)

III-11 Essai de la souche originale Brevibacterium sp. R312

Un essai a été conduit à l'ENSAM en fermenteur pilote Biolafitte de 2 litres afin d'observer la croissance de la souche Brevibacterium R312 ainsi que ses potentialités de détoxification du manioc. Le type d'agitateur de ce fermenteur impliquait que la pulpe de manioc soit additionnée d'eau de manière à en diminuer la viscosité. Ce type de fermenteur, et les précautions prises au moment du broyage du manioc, permettaient d'éviter les contaminations extérieures mais la pulpe ne pouvait toutefois pas être stérilisée sous peine de détériorer ses caractéristiques rhéologiques et d'inactiver la linamarase endogène. La croissance de Brevibacterium R312 dans ce milieu fut faible et tardive. Le développement des bactéries lactiques et l'acidification de la pulpe furent perturbés, vraisemblablement à cause de la forte aération du milieu. La détoxification fut très rapide dès l'inoculation de Brevibacterium R312 mais, comme en atteste la fermentation témoin, l'aération importante du milieu permettait d'atteindre le même résultat après 4 heures.

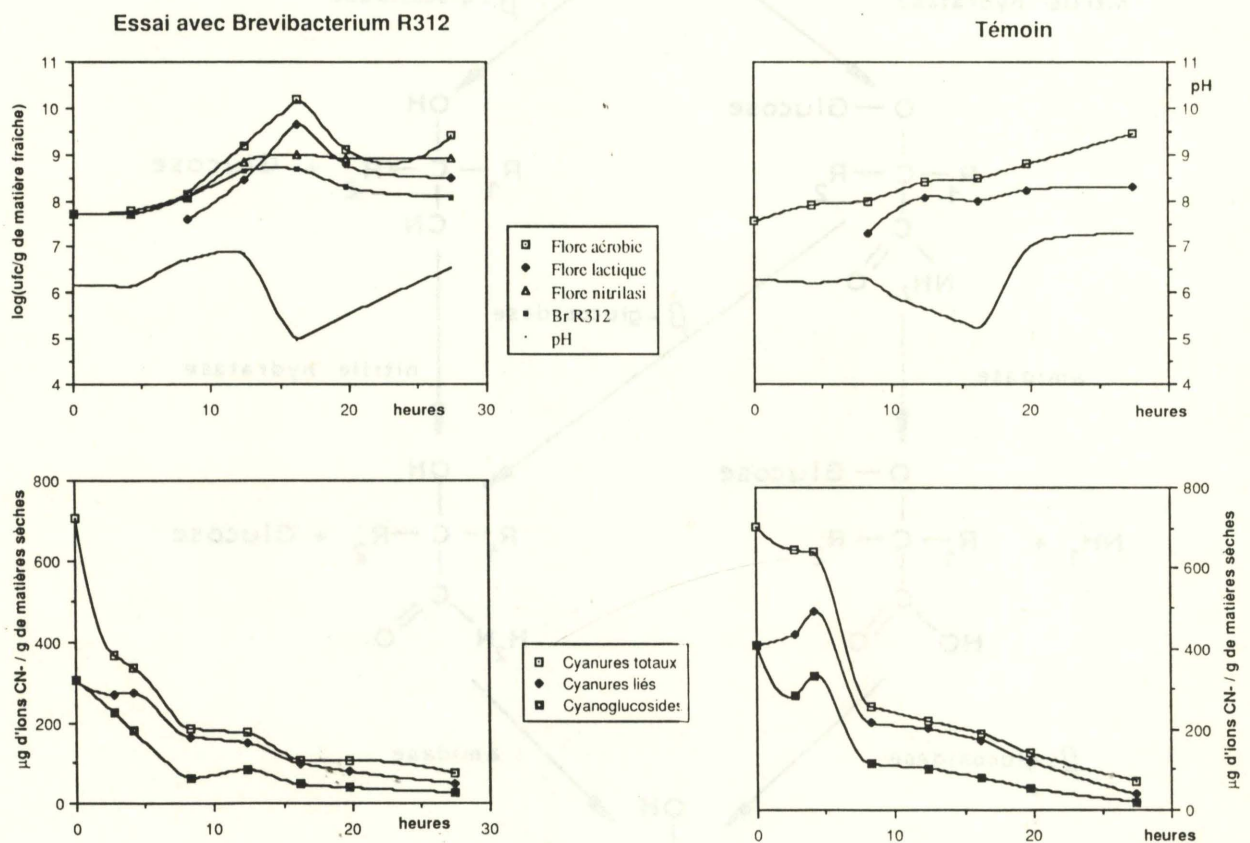
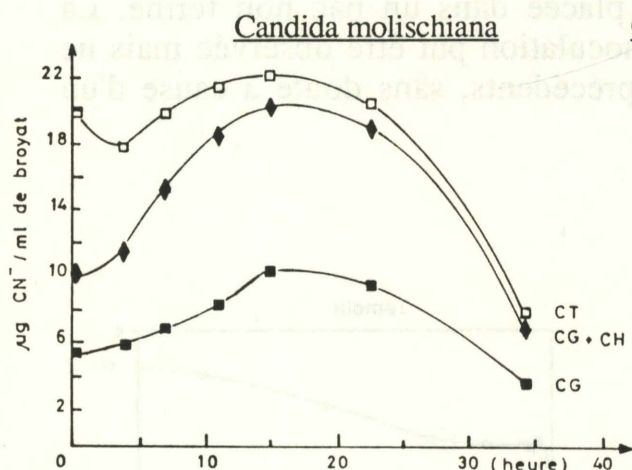
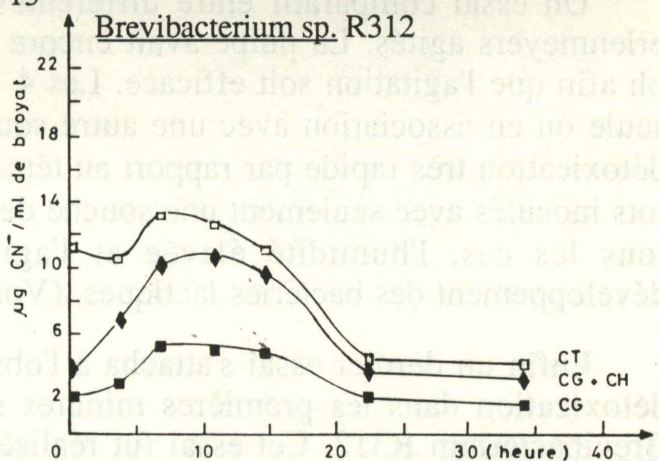
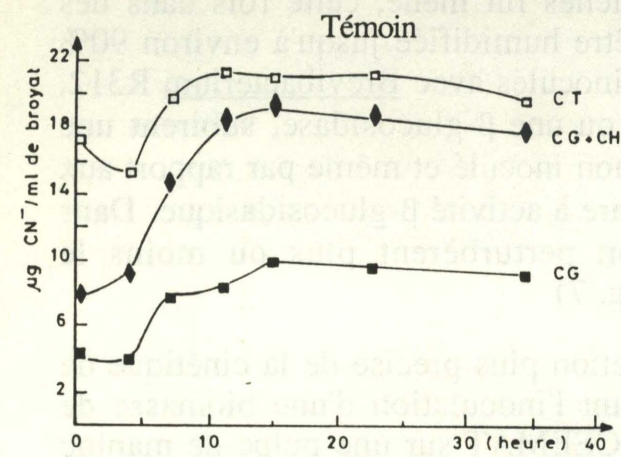
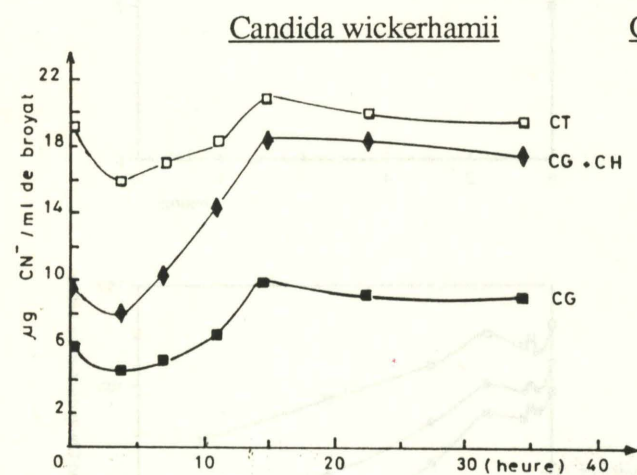
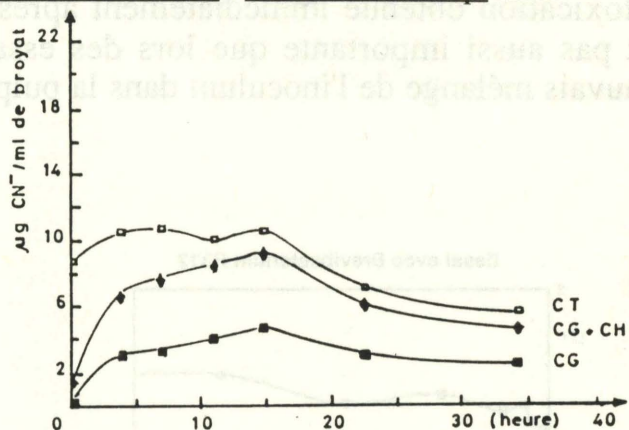


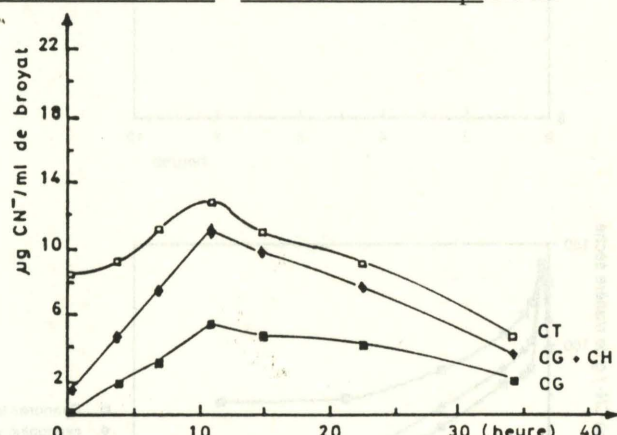
Figure 6 : Détoxification de pulpe de manioc par Brevibacterium en milieu liquide, agité et aéré.



***Candida molischiana* + *Brevibacterium* sp. R312**



***Candida wickerhamii* + *Brevibacterium* sp. R312**



***Brevibacterium* sp. R312 + β -glucosidase**

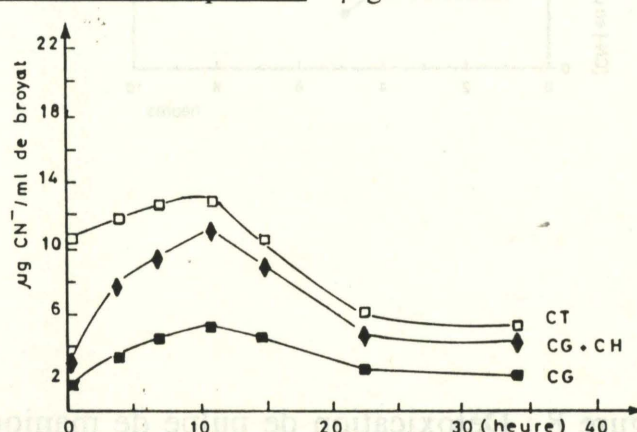


Figure 7 : Essai comparatif de différents inoculum sur la détoxification de pulpe de manioc en milieu liquide et agité

Un essai comparatif entre différentes souches fut mené, cette fois dans des erlenmeyers agités. La pulpe avait encore dû être humidifiée jusqu'à environ 90% bh afin que l'agitation soit efficace. Les 4 lots inoculés avec Brevibacterium R312, seule ou en association avec une autre souche ou une β -glucosidase, subirent une détoxification très rapide par rapport au témoin non inoculé et même par rapport aux lots inoculés avec seulement une souche de levure à activité β -glucosidasique. Dans tous les cas, l'humidité élevée et l'agitation perturbèrent plus ou moins le développement des bactéries lactiques. (Voir Fig. 7)

Enfin un dernier essai s'attacha à l'observation plus précise de la cinétique de détoxification dans les premières minutes suivant l'inoculation d'une biomasse de Brevibacterium R312. Cet essai fut réalisé au CEEMAT sur une pulpe de manioc non humidifiée, donc à environ 70% bh, et placée dans un bac non fermé. La détoxification obtenue immédiatement après l'inoculation put être observée mais ne fut pas aussi importante que lors des essais précédents, sans doute à cause d'un mauvais mélange de l'inoculum dans la pulpe.

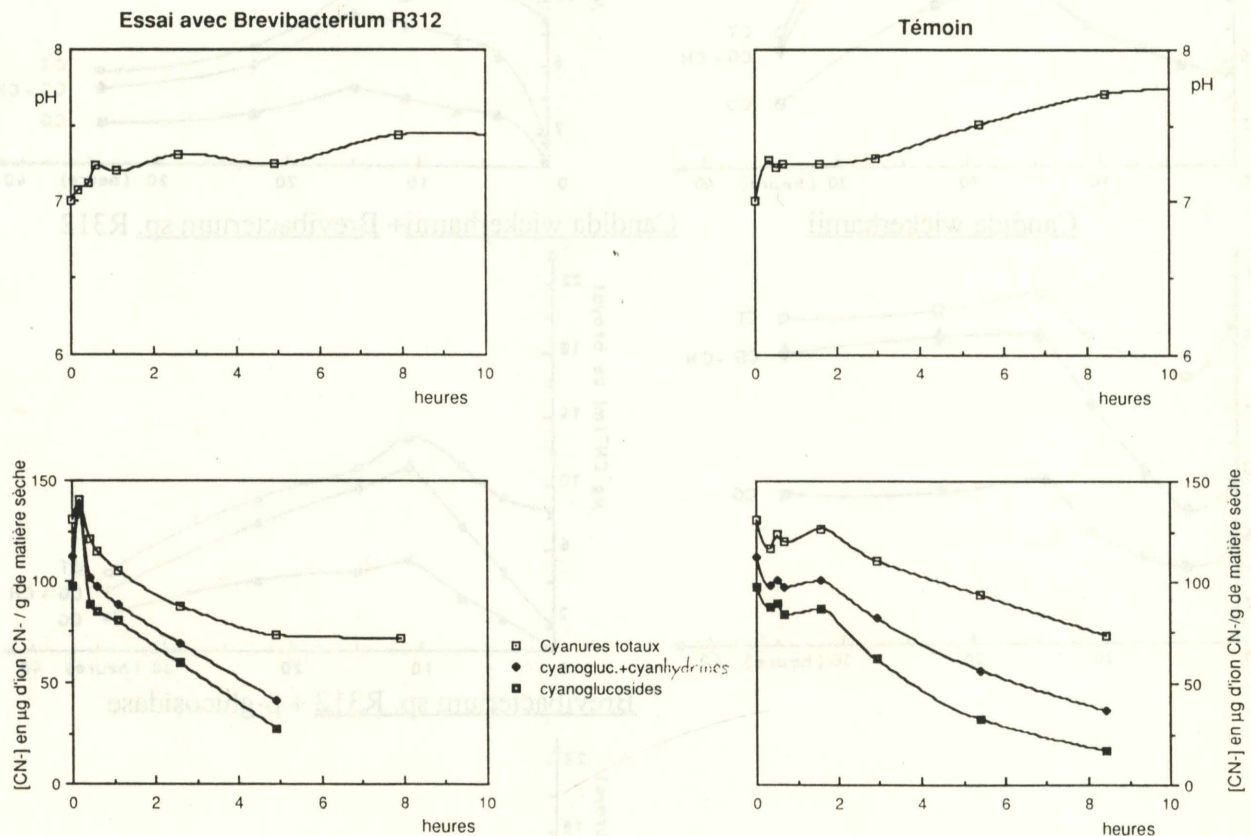


Figure 8 : Détoxification de pulpe de manioc par Brevibacterium en milieu pâteux, non agité et non aéré

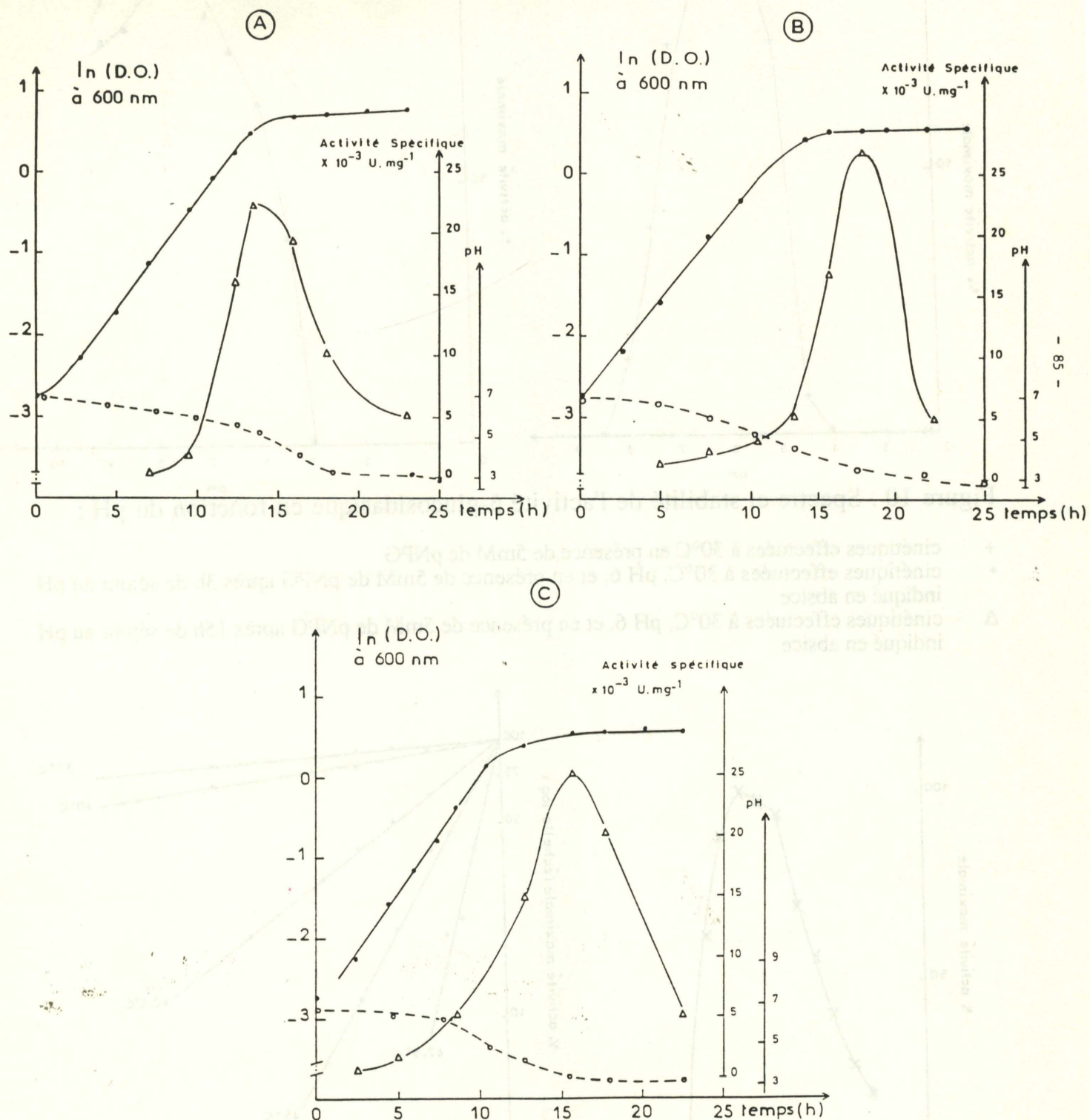
III-12 Étude de la β -glucosidase de Brevibacterium sp. R312

Figure 9 : Courbes de biosynthèse de la β -glucosidase de Brevibacterium sp. R312 au cours de la croissance sur des milieux de culture contenant 0,5% de glucose (A), 1% de glucose (B), ou 2% de glucose (C).

—•—•— Absorbance à 600 nm
 Δ — Δ — Activité β -glucosidasique ($\text{U} \cdot \text{mg}^{-1}$)
 o - - - o pH

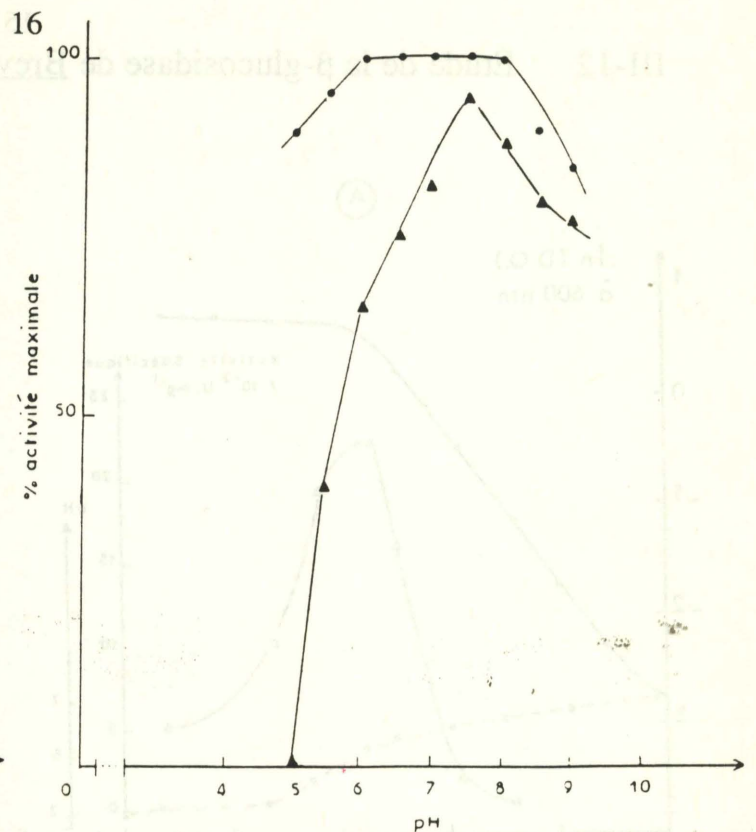
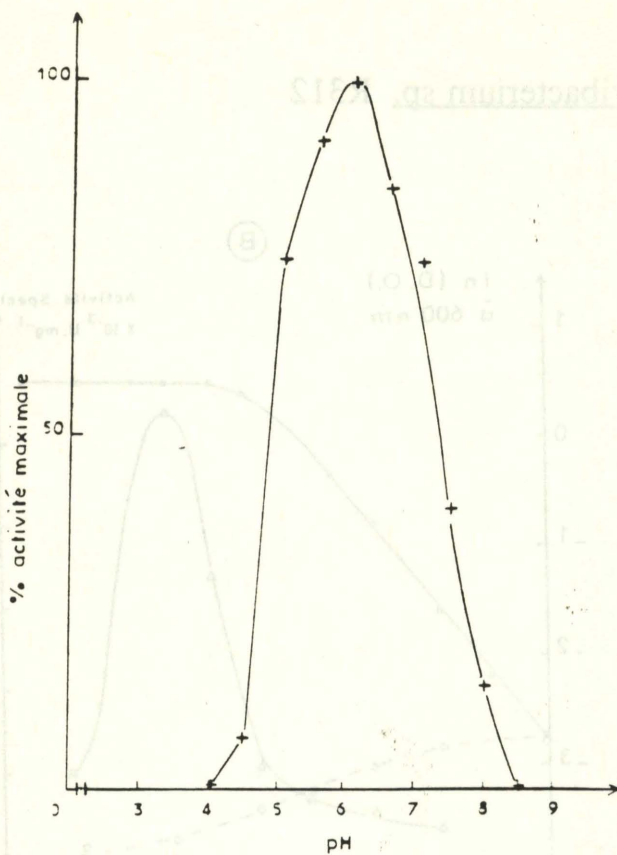


Figure 10 : Spectre et stabilité de l'activité β -glucosidasique en fonction du pH :

- + cinétiques effectuées à 30°C en présence de 5mM de pNPG
- cinétiques effectuées à 30°C, pH 6, et en présence de 5mM de pNPG après 3h de séjour au pH indiqué en abscisse
- Δ cinétiques effectuées à 30°C, pH 6, et en présence de 5mM de pNPG après 15h de séjour au pH indiqué en abscisse

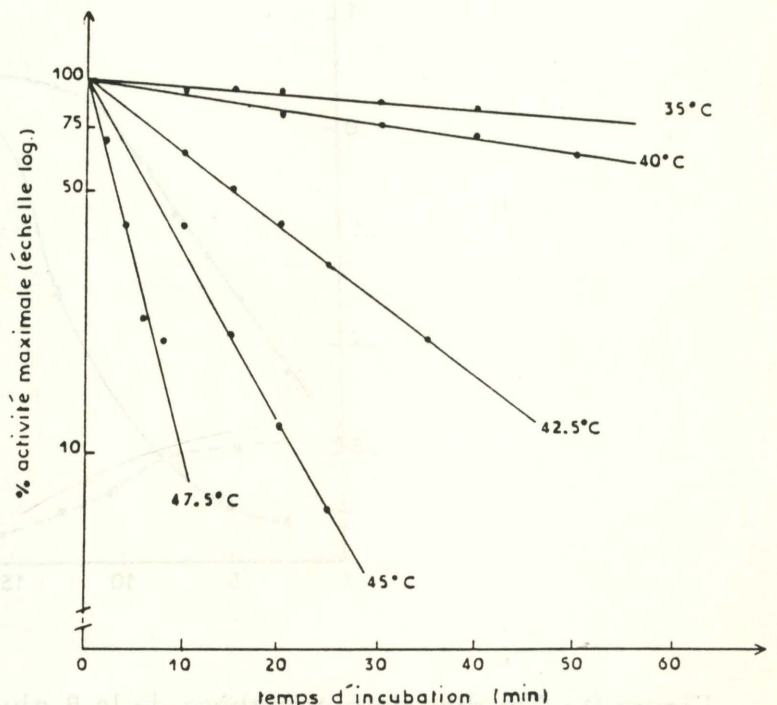
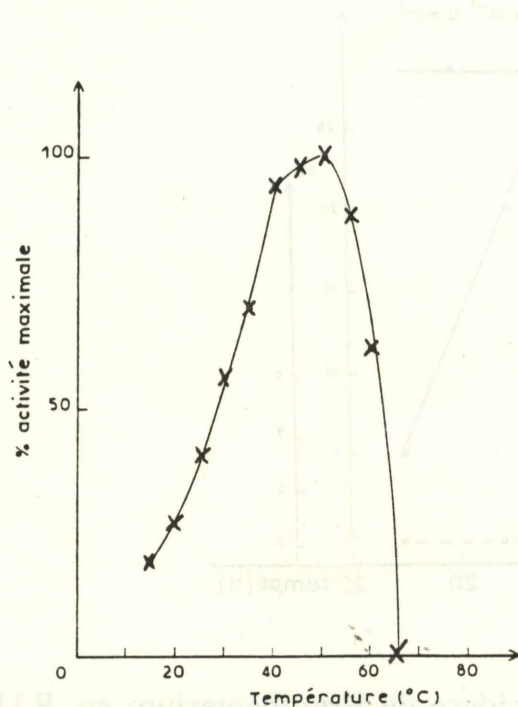


Figure 11 : Spectre d'activité et stabilité de l'activité β -glucosidasique en fonction de la température

- x cinétiques effectuées à pH 6, en présence de 5mM de pNPG
- cinétiques effectuées à pH 6, 30°C, en présence de 5mM de pNPG, après dénaturation thermique à la température et pendant le temps indiqués

Temps d'incubation (heures)	citrate de MAC ILVAINE	phosphate de SORENSEN	Tris HCl	Hepes NaOH
0	100	100	100	100
24	62	50	34	20
48	39	28	21	1

Figure 12 : Stabilité de la β -glucosidase dans différents tampons

Substrat	Km (mM)	Vm (U.mg ⁻¹)
pNPG	0,054	1,24
oNPG	0,086	0,44
Esculine	1,7	1,70
Arbutine	5,6	1,30
Salicine	6,4	9,30
Prunassine	0,39	3,20
Linamarine	3,7	0,85
pNP Xylose	0,35	0,07

Figure 13 : Km et Vm de la β -glucosidase vis à vis de différents cyanoglucosides (dont la linamarine, cyanoglucoside dominant du manioc)

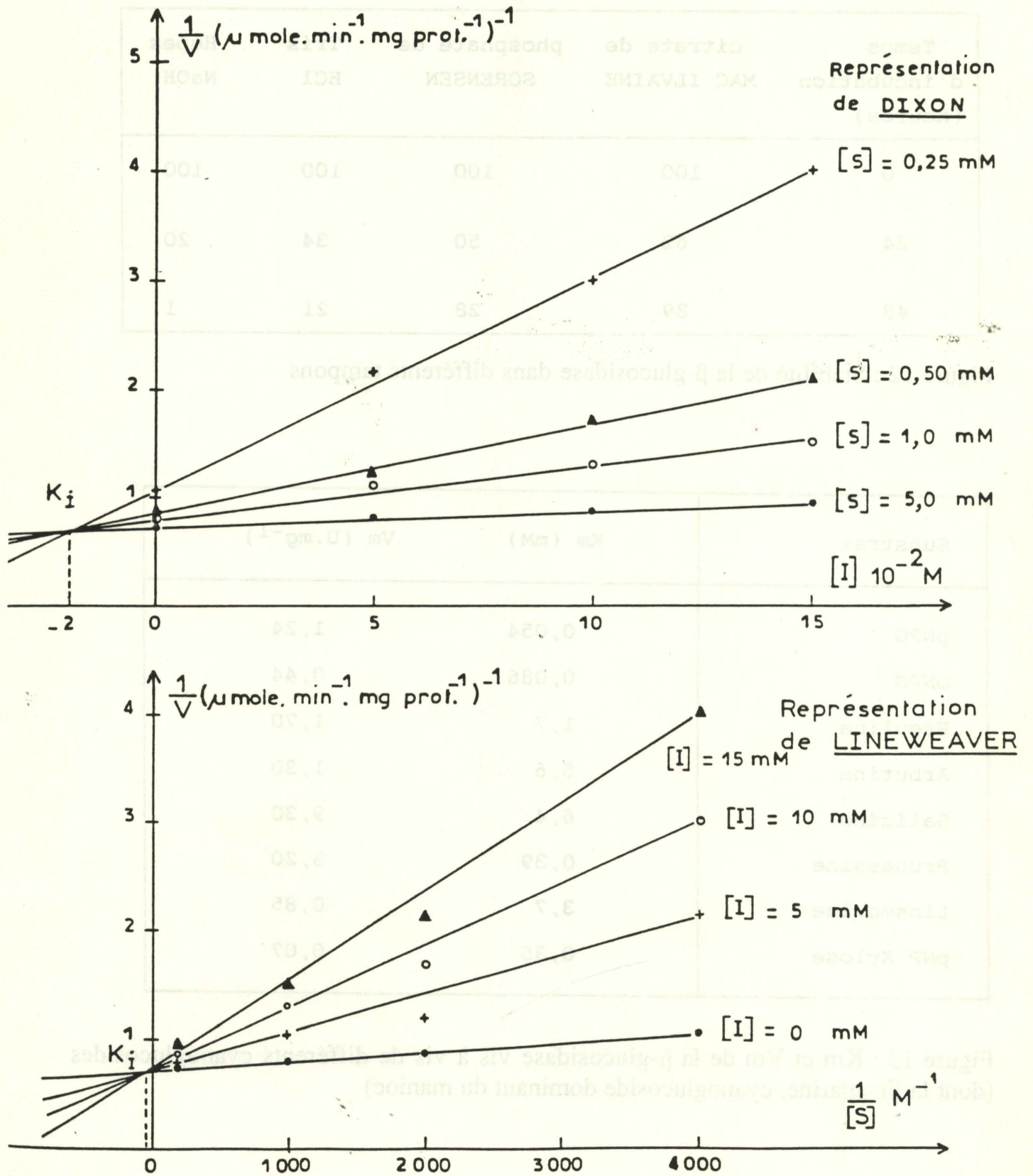


Figure 14 : Inhibition de l'activité β -glucosidasique par le glucose

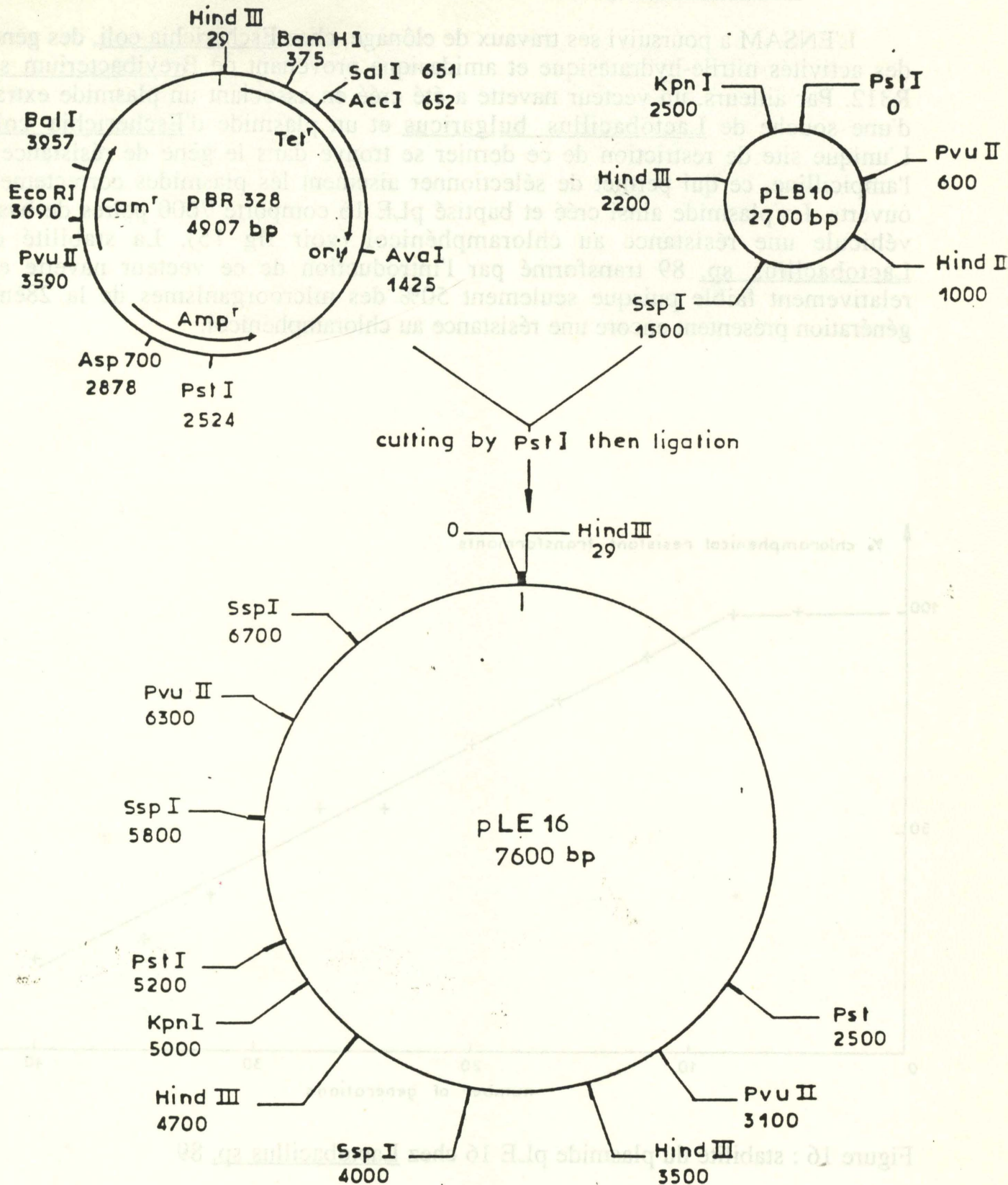


Figure 15 : Sites de restriction du plasmide pLE 16

III-13 Recherche des possibilités de transfert des systèmes enzymatiques de Brevibacterium sp. R312 à une souche de Lactobacillus

L'ENSAM a poursuivi ses travaux de clonage, chez Escherichia coli, des gènes des activités nitrile-hydratase et amidase provenant de Brevibacterium sp. R312. Par ailleurs, un vecteur navette a été créé en associant un plasmide extrait d'une souche de Lactobacillus bulgaricus et un plasmide d'Escherichia coli. L'unique site de restriction de ce dernier se trouve dans le gène de résistance à l'ampicilline, ce qui permet de sélectionner aisément les plasmides correctement ouverts. Le plasmide ainsi créé et baptisé pLE 16 comporte 7600 paires de base, véhicule une résistance au chloramphénicol (voir fig 15). La stabilité de Lactobacillus sp. 89 transformé par l'introduction de ce vecteur navette est relativement faible puisque seulement 50% des microorganismes de la 28ème génération présentent encore une résistance au chloramphénicol.

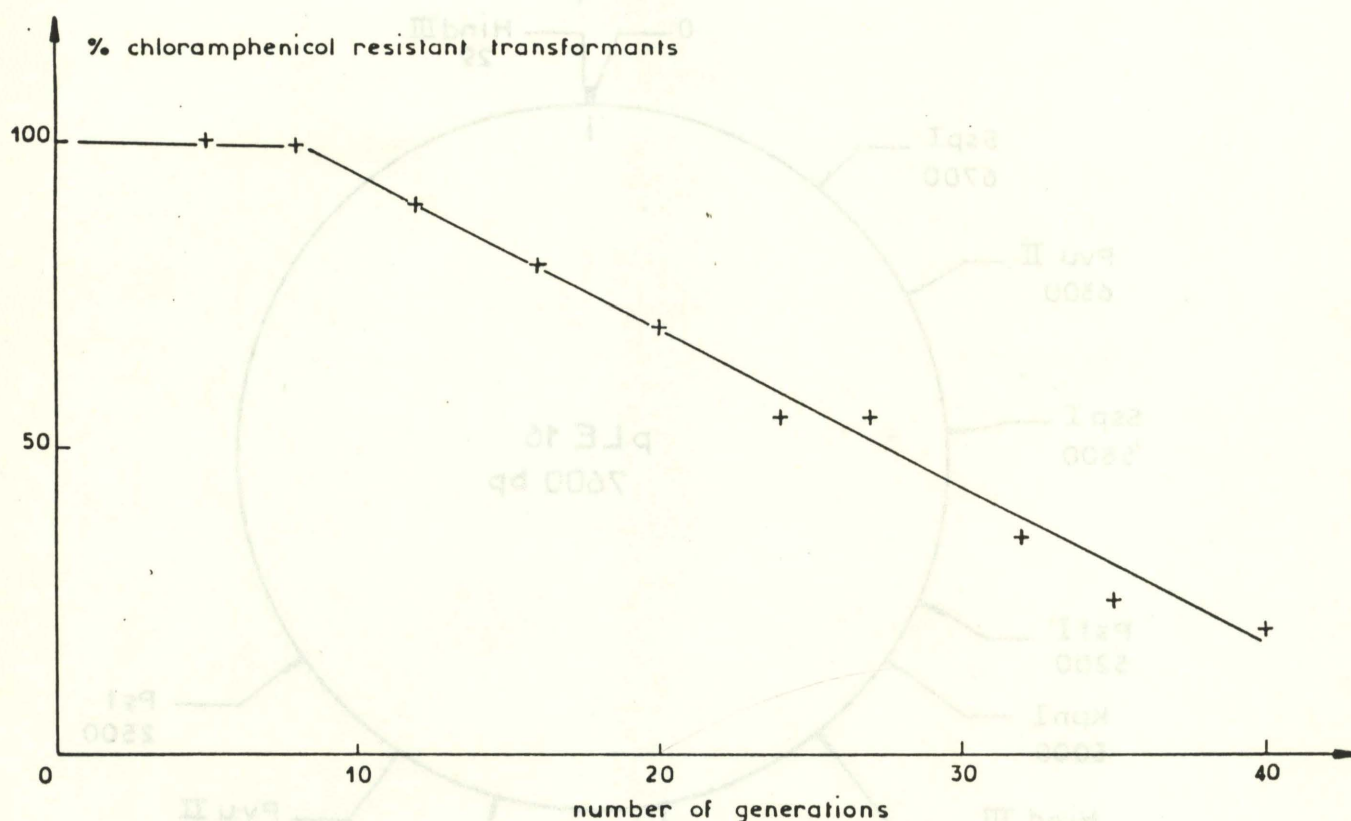


Figure 16 : stabilité du plasmide pLE 16 chez Lactobacillus sp. 89

L'ENSAM s'apprête à essayer le vecteur navette pLE 16 pour transférer les gènes de l'amidase générale et de la nitrile-hydratase, clonées chez Escherichia coli, à Lactobacillus sp. 89 puis à des Lactobacillus isolés dans des échantillons de manioc. En cas de succès, c'est à dire si ces gènes parviennent à s'exprimer dans la souche hôte, des essais de fermentation de manioc avec inoculation de Lactobacillus transformé pourraient être envisagés courant 91.

III-3 Définition et réalisation d'un fermenteur pilote de laboratoire (CEEMAT)

Le premier rôle que doit jouer ce nouvel appareil de laboratoire est de permettre de réaliser des suivis de fermentation de pulpe de manioc, en France, dans des conditions expérimentales correctes et confortables, c'est à dire :

- avec un dispositif de malaxage efficace mais n'engendrant que peu de contraintes de cisaillement dans la pulpe,
- avec de nombreuses possibilités de mesurer, réguler ou faire varier des paramètres (température, aération, brassage, pH du jus, vitesse de circulation du jus, pression de couverture, humidité du milieu),
- avec des dispositifs de renouvellement de l'atmosphère, d'introduction d'inoculum et de prise d'échantillons associant facilité d'utilisation et protection efficace vis à vis des contaminations extérieures.

D'autre part, le projet de développement gagnerait un temps précieux si l'appareil pouvait déjà être préfiguratif d'un fermenteur industriel et constituer un banc d'essai de diverses solutions technologiques imaginées pour résoudre les problèmes notamment :

- de facilité de chargement, déchargement et nettoyage,
- de fiabilité, de rusticité, de simplicité d'entretien,
- de compatibilité de la motorisation avec les formes d'énergies disponibles en milieu rural africain,
- de compatibilité du prix avec les capacités d'investissement des unités de transformation semi-industrielles.

III-31 Définition du cahier des charges

- Système de malaxage type "bétonnière
- Vitesse de rotation : 5 à 10 tr•min⁻¹
- Inclinaison de l'axe : variable entre 10° à 30°.
- Maîtrise de l'aération par renouvellement périodique de l'atmosphère
- Volume utile : 15 litres de pulpe
- Régulation de la température par circuit d'eau en "double paroi"
- Circulation du jus : possibilité de mesure en continu et de régulation, circulation à l'abrit de toute contamination, possibilité de réinjecter dans le fermenteur la totalité du jus extrait, débit minimum de circulation 1 litre/h.

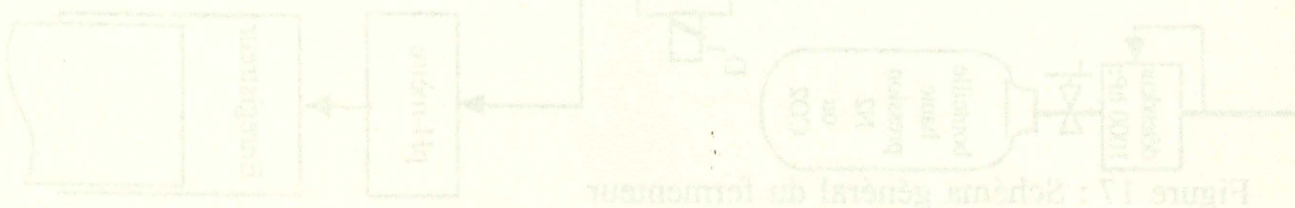
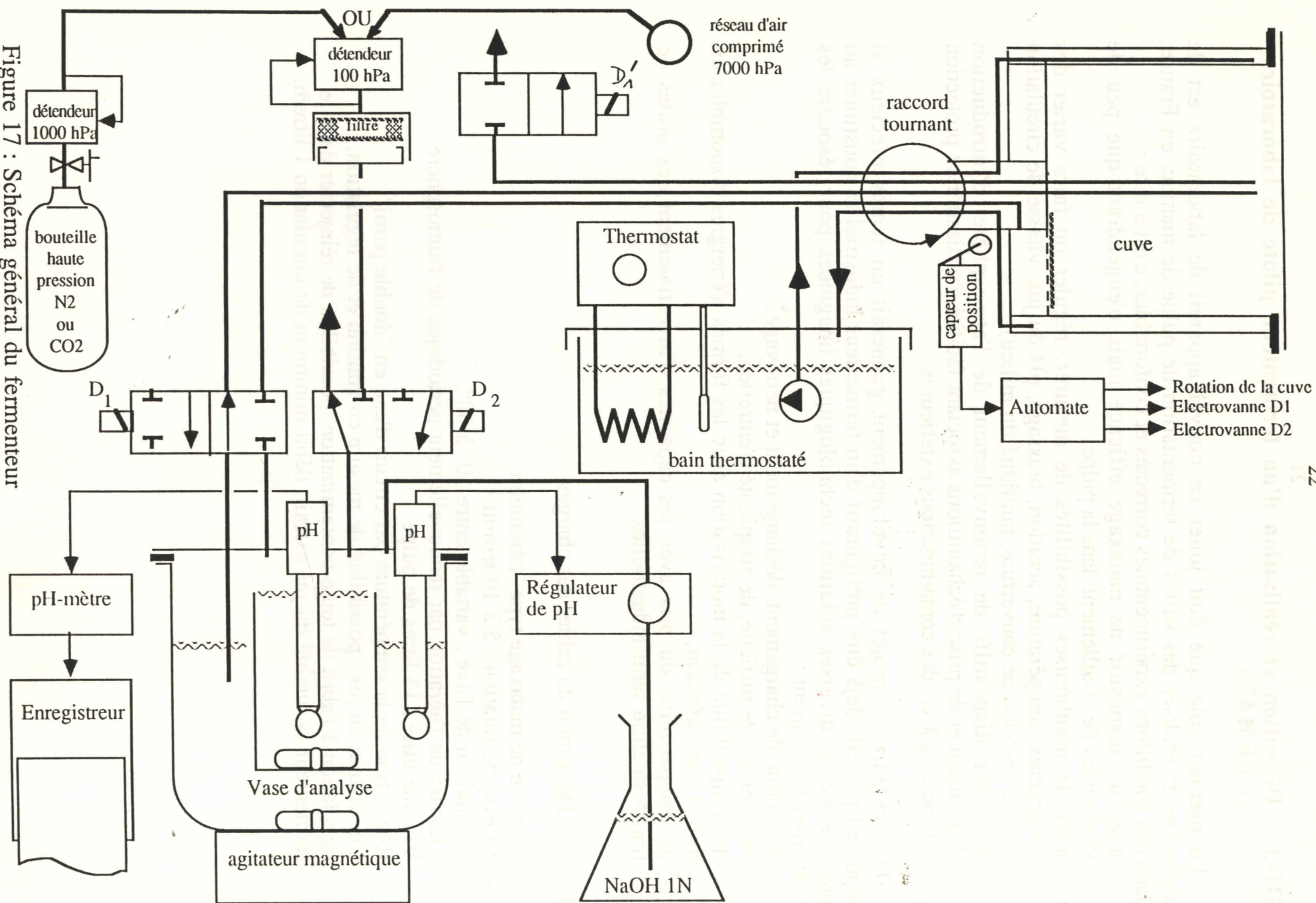


Figure 17 : Schéma général du fermenteur



III-32 Fonctionnement du fermenteur

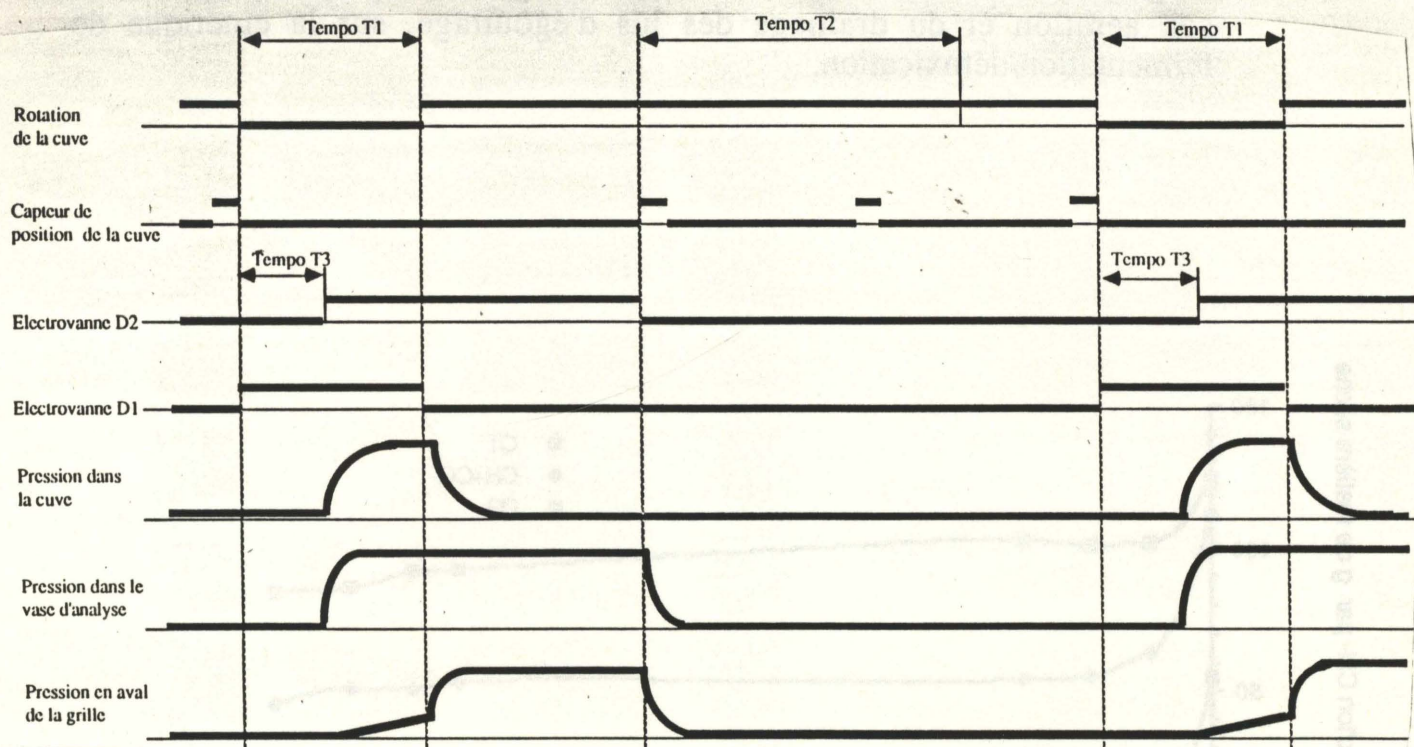


Figure 18 : Cycle automatique de fonctionnement du fermenteur

L'égouttage de la pulpe à travers un tamis doit être forcé par une différence de pression entre l'amont et l'aval du tamis de 100 hPa maximum. Le taux de remplissage nominal garantit qu'approximativement la moitié du fond de la cuve se trouve sous le niveau de la pulpe. Le tamis occupe seulement un secteur du fond du fermenteur. Le jus récupéré dans le "caisson" en aval du tamis ne peut s'écouler par gravité jusqu'au circuit d'analyse que lorsque ce caisson atteint la position haute au cours de la rotation de la cuve du fermenteur. Dans la zone en amont de la grille, c'est à dire la partie contenant la pulpe, une pression de couverture peut être appliquée (100 hPa maximum). Un automatisme réalisé en "logique câblée à contact" assure le cycle de fonctionnement suivant :

- 1 cuve arrêtée (grille en position basse), essorage de la pulpe contre la grille par application d'une pression de couverture (temporisation T1 — temporisation T3)
 - 2 premier tour lors de la remise en rotation de la cuve, décolmattage de la grille par envoi de gaz par l'arrière de la grille
 - 3 tours suivants, vidange du "caisson aval" par gravité jusque dans le réacteur d'analyse (temporisation T2 + fraction de tour de façon à arrêter la cuve avec la grille en position basse)
 - 4 cuve arrêtée (grille en position basse), redescende de la pulpe et obstruction complète de la grille (temporisation T3)
 - 5 cuve arrêtée, réinjection du jus analysé dans la cuve du fermenteur.
- Bouclage sur l'étape 1

III-4 Recherche d'une optimisation du procédé naturel de détoxification (CEEMAT)

III-41 Observation de l'influence de la maîtrise du pH de la pulpe de manioc, de son aération et du drainage des jus d'égouttage, sur la cinétique de fermentation/détoxification.

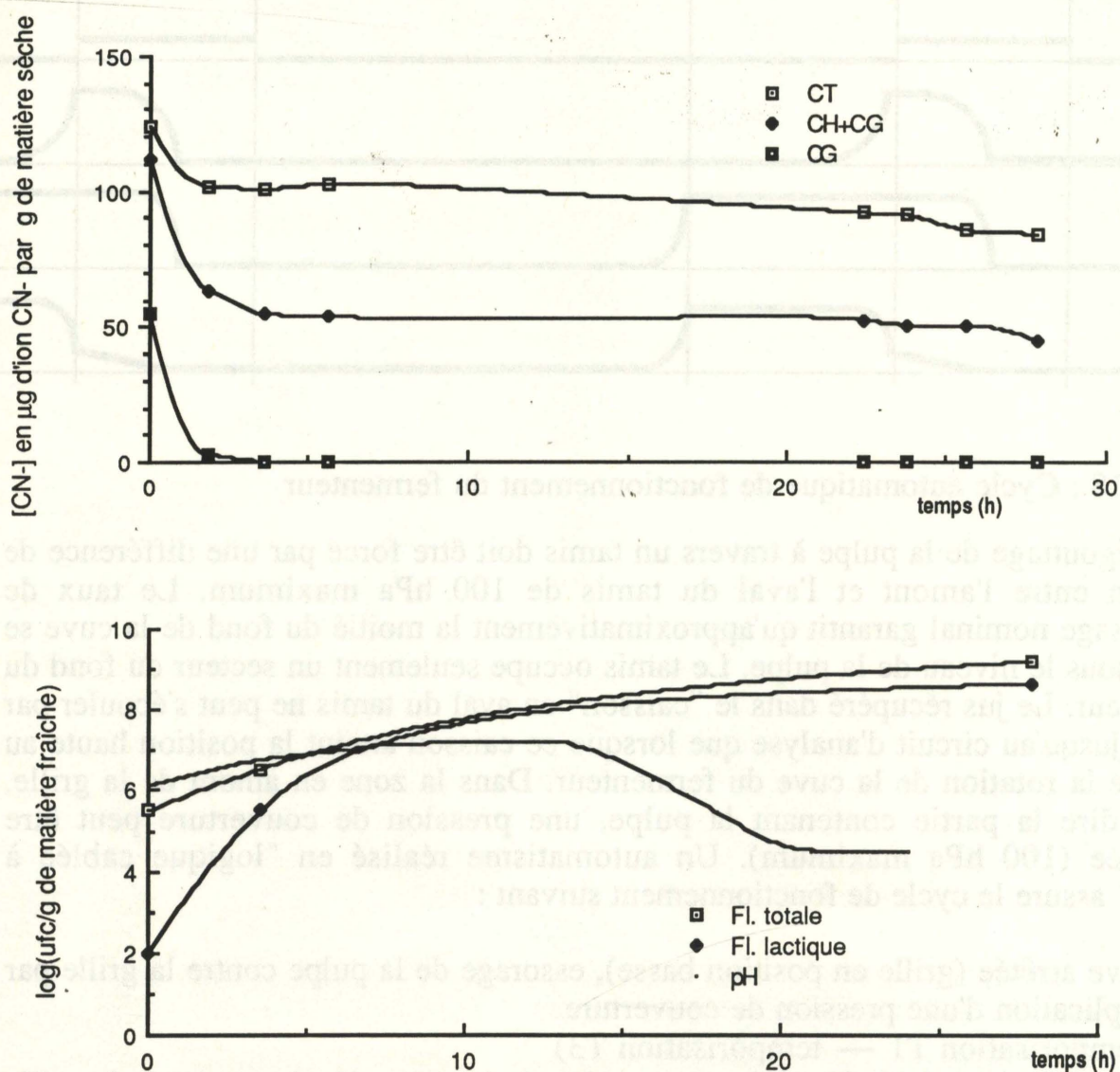


Figure 19 : Fermentation de 15 kg de pulpe de manioc, avec régulation du jus à pH 7 pendant 12 heures

La dégradation des cyanoglucosides, sous l'effet de la linamarase endogène, est totale au bout de 4 heures mais les cyanhydrines formées sont stables

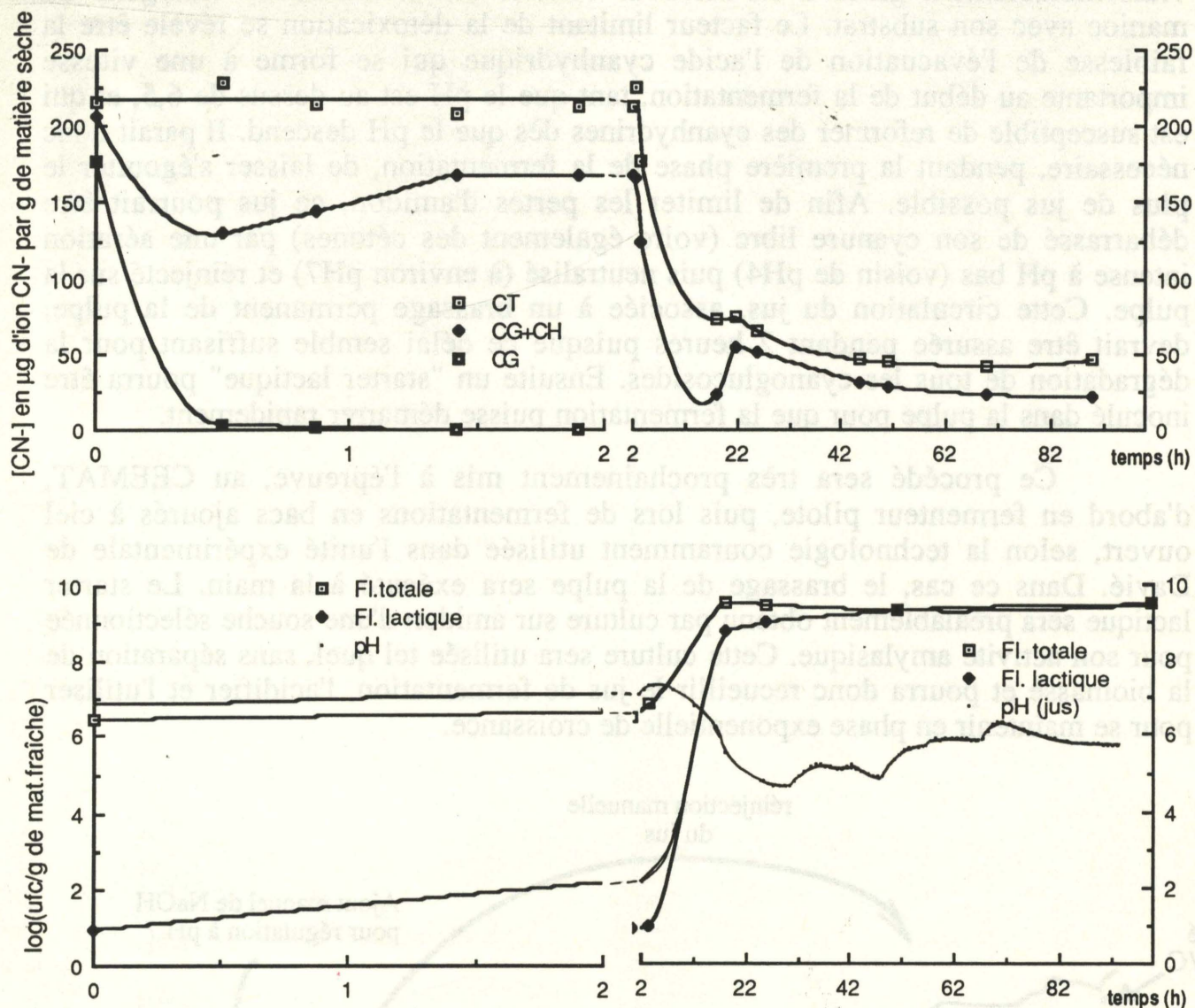


Figure 20 : Fermentation de 15 kg de pulpe de manioc, avec oscillation de la consigne de pH

Cet essai permet de confirmer la réversibilité de la réaction d'hydrolyse des cyanhydrines en acide cyanhydrique. Dans les phases où le pH est élevé, le rapport Cyanhydrines/HCN est voisin de 1. Lorsque le pH descend, une partie des cyanhydrine se retransforme en HCN et le rapport monte jusqu'à 2,5.

III-42 Définition d'un protocole de conduite de la fermentation et des équipements nécessaires

De toutes les observations réalisées, il ressort que le brassage de la pulpe semble améliorer notablement la vitesse de dégradation des cyanoglucosides, vraisemblablement grâce à un meilleur contact de la linamarase endogène du manioc avec son substrat. Le facteur limitant de la détoxication se révèle être la faiblesse de l'évacuation de l'acide cyanhydrique qui se forme à une vitesse importante au début de la fermentation, tant que le pH est au dessus de 6,5, et qui est susceptible de reformer des cyanhydrines dès que le pH descend. Il paraît donc nécessaire, pendant la première phase de la fermentation, de laisser s'égoutter le plus de jus possible. Afin de limiter les pertes d'amidon, ce jus pourrait être débarrassé de son cyanure libre (voire également des cétones) par une aération intense à pH bas (voisin de pH4) puis neutralisé (à environ pH7) et réinjecté sur la pulpe. Cette circulation du jus, associée à un brassage permanent de la pulpe, devrait être assurée pendant 2 heures puisque ce délai semble suffisant pour la dégradation de tous les cyanoglucosides. Ensuite un "starter lactique" pourra être inoculé dans la pulpe pour que la fermentation puisse démarrer rapidement.

Ce procédé sera très prochainement mis à l'épreuve, au CEEMAT, d'abord en fermenteur pilote, puis lors de fermentations en bacs ajourés à ciel ouvert, selon la technologie couramment utilisée dans l'unité expérimentale de Davié. Dans ce cas, le brassage de la pulpe sera exécuté à la main. Le starter lactique sera préalablement obtenu par culture sur amidon d'une souche sélectionnée pour son activité amylasique. Cette culture sera utilisée tel quel, sans séparation de la biomasse et pourra donc recueillir le jus de fermentation, l'acidifier et l'utiliser pour se maintenir en phase exponentielle de croissance.

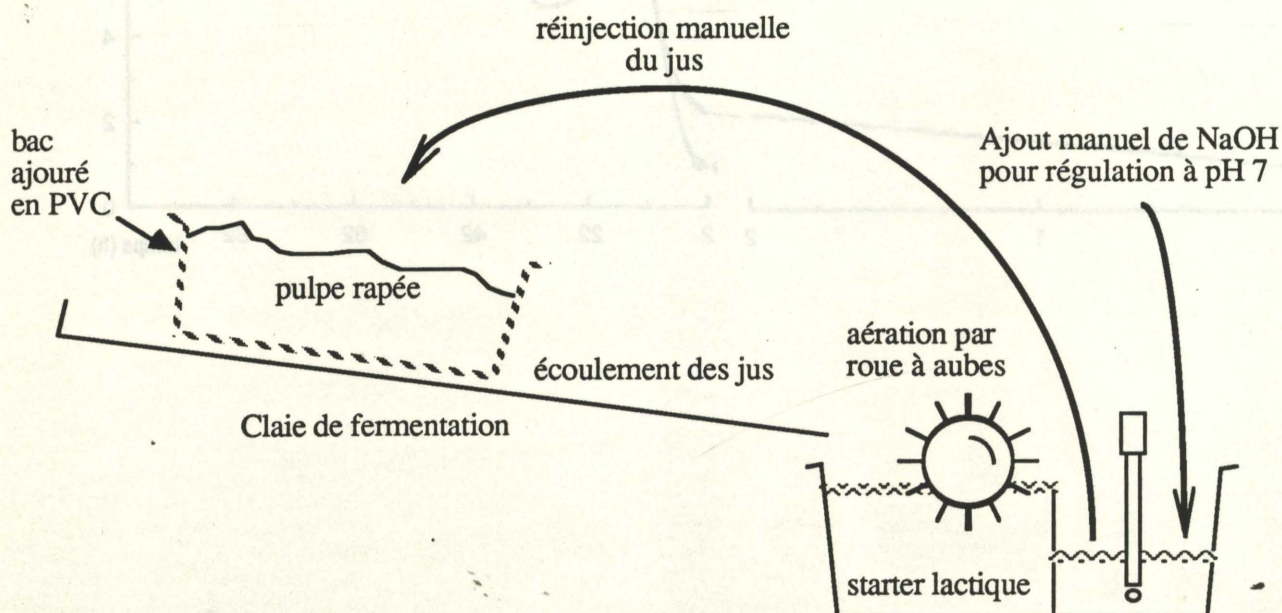


Figure 21 : Procédé de fermentation qui sera prochainement transféré à l'unité expérimentale de Davié

IV- Conclusions et Perspectives

Les deux voies imaginées initialement pour améliorer la détoxification de la pulpe de manioc râpée apparaissent viables.

La solution par maîtrise du pH devrait pouvoir être mise en œuvre, prochainement, sur l'unité de Davié car seule l'expérimentation à l'échelle semi-industrielle permettra de lever les incertitudes qui subsistent quant aux risques de contaminations par des souches indésirables et aux caractéristiques organoleptiques du produit fini. Cependant, ce transfert en région chaude nécessite encore quelques essais en laboratoire afin de préciser le protocole de conduite de la fermentation. Ce processus, bien que particulièrement simple dans son principe, exigera pourtant plusieurs interventions d'opérateurs au cours de la fermentation. L'équipement (bacs en plastique, claies de fermentation avec collecte des jus d'égouttage), les "intrants" (soude) et les matières consommables d'analyse (indicateurs de pH), le niveau de qualification des opérateurs et le coût de leurs interventions affecteront inévitablement le prix de revient du gari.

L'alternative qu'offrirait une souche lactique produisant des enzymes à activités "cyanolytiques" et parvenant à se maintenir dans le "pied de cuve" dans chaque unité de production où elle aurait été introduite, reste donc particulièrement intéressante. En effet, la mise en œuvre d'un tel procédé n'exigerait aucune modification des équipements ni aucune intervention au cours de la fermentation. La poursuite des recherches en vue de créer, par génie génétique, cette bactérie peut donc toujours être considérée comme pertinente. Il est par contre à signaler que des problèmes de "protection industrielle" d'une telle souche pourraient bientôt apparaître.

Le CEEMAT s'est vu confier, en septembre 1989, par la Communauté Economique Européenne, la maîtrise d'œuvre d'un projet intitulé "Amélioration de la qualité des aliments fermentés à base de manioc". Grâce au financement de ce projet, la poursuite des travaux engagés sur l'optimisation des mécanismes de détoxification pourra donc être assurée partiellement. Le transfert sur le site de Davié du protocole de conduite de la fermentation par contrôle du pH devrait pouvoir être réalisé au cours de l'année 1991, en collaboration avec l'INPT. Les essais d'évaluation des potentialités de détoxification de la souche Brevibacterium sp. R312 en milieu pâteux seront également exécutés en 1991 au CEEMAT, de même que les travaux de génie génétique seront poursuivis par l'ENSA-M. Les fonds que ce projet CEE permet de consacrer à ces recherches apparaissent cependant nettement insuffisants pour couvrir le champ immense s'étendant du génie génétique jusqu'au transfert industriel, accompagné de mesures de protections juridiques (brevets) et d'une promotion commerciale du produit fini sur les marchés locaux et export. Une requête sera donc prochainement formulée auprès de différents bailleurs de fonds potentiels.

Il est enfin à signaler que le CEEMAT continuera, au moins au cours des deux années à venir, à travailler sur l'optimisation de l'ensemble du processus de transformation du manioc en gari et notamment sur les possibilités de mécanisation des phases d'épluchage et de cuisson.

V - Publications et communications dans le cadre du présent contrat

- Arnaud, A.; Galzy, P.; 1989. Biological hydrolysis of nitriles and amides : Biotechnological applications. *Revista Latinoamericana de Química (MEX)*, (sous presse)
- Bernet, N.; 1989. Amélioration génétique d'une souche de Brevibacterium sp. à activité nitrilasique et amidasique et mise au point d'un réacteur de bioconversion. Thèse de docteur ingénieur ENSAM, Montpellier (F)
- Bernet, N.; Arnaud, A.; Galzy, P.; 1990. Optimization of culture conditions of Brevibacterium sp. R312 for production of nitrile hydratase. *Biocatalysis*, 3, 259-267
- Chagnaud, P.; Chian Kwo Chion, C.K.N.; Arnaud, A.; Galzy, P.; 1990. Construction of a new vector shuttle for Lactobacillus. 6th International Symposium on the Genetics of the industrial microorganisms. 12-18 august 1990, Strasbourg (F)
- Chagnaud, P.; Chian Kwo Chion, C.K.N.; Duran, R.; Naouri, P.; Arnaud, A.; Galzy, P.; 1990. Construction of a new vector shuttle for Lactobacillus. (à paraître)
- Chuzel, G.; 1989. Etude des traitements technologiques intervenant lors de la transformation du manioc en gari, Thèse, ENSA, Montpellier (F)
- Ekue, G.; 1989. Essais d'équipement de l'unité de transformation du manioc de Davié, Rapport de stage, ENSIA, Massy (F), Doc CEEMAT
- Igbeka, J.C.; Jory, M.; Griffon, D.; 1990. Proposition of machines for the selective mechanization of gari processing. *Agricultural mechanization in Asia, Africa and Latin America (A.M.A.)*, Tokyo (JAP), (à paraître)
- Jory, M.; 1989. Contribution à l'étude de deux processus de transformation du manioc comportant une phase de fermentation : Le gari au Togo et l'amidon aigre en Colombie. Mémoire de Mastère ENSIA, Massy (F)
- Kaaked, M.R.; Legras, J.L.; Duran, R.; Chian Kwo Chion, C.K.N.; Arnaud, A.; Galzy, P.; 1990. Purification and properties of the nitrile hydratase of a new strain of Rhodococcus sp. (à paraître)
- Legras, J.L.; 1990. Etude des voies de dégradation des cyanoglucosides d'une souche de Brevibacterium sp. R312 : Application à la détoxification du manioc. Thèse de docteur ingénieur ENSAM, Montpellier (F)
- Legras, J.L.; Chuzel, G.; Arnaud, A.; Galzy, P.; 1989. Natural nitriles and their metabolism. *World Journal of Microbiology and biotechnology (incorporating MIRCEN Journal)* (GB), (sous presse)
- Legras, J.L.; Jory, M.; Arnaud, A.; Galzy, P.; 1990. Detoxification of cassava pulp using Brevibacterium sp. R312. *J. Applied Microbiology and Biotechnology (RFA)*, 33 : 529-533
- Legras, J.L.; Kaaked, M.R.; Arnaud, A.; Galzy, P.; 1989. Purification and properties of the β -glucosidase from a nitrile hydratase producing Brevibacterium sp. strain R312. *J. Basic Microbiology (RDA)* 29 10, 665-669
- Legras, J.L.; Kaaked, M.R.; Arnaud, A.; Galzy, P.; 1989. Degradation of cyanoglucosides by Brevibacterium sp. R312 strain. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 35, 451-461
- Monroy, J.A.; Lebert, A.; Marty, C.; Muchnik, J.; Bimbenet, J.J.; 1990. Simulation of cyanoglucosidic compounds elimination in cassava during drying. Communication at International Drying Symposium, August 1990, Prague (TCH)
- Moreau, J.L.; Bernet, N.; Chian Kwo Chion, C.K.N.; Duran, R.; Arnaud, A.; Galzy, P.; 1990. Optimization of conditions for the production of nitrile hydratase : Application of nitrile

hydratase and amidases of Brevibacterium. The industrial applications of natural, modified and artificial enzymes, International Conference 23-29 sept. 1990, Pisa (I)

Vasserot, Y.; Chemardin, P.; Arnaud, A.; Galzy, P.; 1989. Evidence for the β -glucosidase activity and cellobiose fermentation by various Kloeckera strains. Acta Biotechnologica (RDA) (sous presse)

Vasserot, Y.; Christiaens, H.; Chemardin, P.; Arnaud, A.; Galzy, P.; 1989. Purifications and properties of a β -glucosidase of Hanseniaspora vineae Van der Walt and Tscheuschner with the view to its utilization in fruit aroma liberation. J. Appl. Bacteriol. (GB), 66, 271-279

Références

Bui, K.; Fradet, H.; Arnaud, A.; Galzy, P.; 1984. A nitrile hydratase with a wide substrate spectrum produced by a Brevibacterium sp.. Journal of General Microbiology, 130, 89-93

Bui, K.; Maestracci, M.; Thiery, A.; Arnaud, A.; Galzy, P.; 1984. A note on the enzymic action and biosynthesis of a nitrile hydratase from a Brevibacterium sp.. Journal of Applied Bacteriology, 57, 183-190

Butler, G.W.; 1965. The distribution of the cyanoglucosides linamarine and lotaustraline in higher plants. Phytochemistry, 1965, 4, 127-131

Chuzel, G.; Griffon, D.; 1987. Le gari : un produit traditionnel fermenté à base de manioc. Aspects fermentation - détoxication., Doc. CEEMAT

Jory, M.; 1987. Transformation du manioc en gari au Togo. Rapport de stage ENSIA, Massy (F), Doc CEEMAT

Maestracci, M.; 1985. Etude de l'amidase générale (acylamide amidohydrolase E.C.3514) de Brevibacterium sp.: Essai de clonage du gène responsable de la synthèse de cette enzyme. Thèse de doctorat de 3ème cycle en Sciences Alimentaires. U.S.T.L. Montpellier (F)

Maestracci, M.; Thiery, A.; Bui, K.; Arnaud, A.; Galzy, P.; 1986. Activity and regulation of an amidase (acylamide amidohydrolase E.C.3514) with a wide substrate spectrum from Brevibacterium sp.. Archives of Microbiology, 138, 315-320

Nambisan, B.; Sundaresan, S.; 1984. Plant toxins. Spectrophotometric determination of cyanoglucosides in cassava. Journal of the Association for Analytical Chemistry, 67, 641-643

Sykes, A.H.; 1981. Early studies on the toxicology of cyanide. in Cyanide in biology. (Vennesland, B.; Conn, E.E.; Knowless, C.J.; Westley, J.; Wissing, F.; Eds), pp 1-10. Academic Press, London (GB)

VI - Rapport financier

Montant total du projet (en FF HT)

833 000

	CEEMAT (40%)	ORSTOM (60%)
	333 200	499 800
Aide accordée (45,5% du montant total)	151 770	227 660
Frais de gestion ORSTOM	5 977	
Total des versements de l'ORSTOM au CEEMAT	145 793	
Frais de gestion CEEMAT	14 627	
Dépenses sur la convention	CEEMAT + INPT	ENSAM
Matière première	3 960	
Consommable de laboratoire	21 900	74 395
Indemnités de stagiaires	26 746	
Déplacements	4 163	
Dépenses sur ressources propres	CEEMAT + INPT	ENSAM
Matière première	38 274	
Consommable de laboratoire	8 500	59 000
Indemnités de stagiaires	13 350	
Déplacements	8 000	
Salaires et charges	41 000	38 000

8/11/90	02/1/102	145793,00	Total Convention		65793,00	66000,00	14000,00
		0,00	Solde		529,73	-8395,11	7865,38
date fact.	N° fact.	fournisseur	libellé	Qté	CEEMAT	ENSAM	INPT
		CEEMAT	fonctionnement général + frais de gestion	1	15569,05	0,00	0,00
28/12/88	7909	Baeckeroot	Pyridine 1	2	465,99		
28/12/88	7909	Baeckeroot	Ac.barbiturique 100 g	2	132,30		
28/12/88	7909	Baeckeroot	Péroxydase 5000U	2	96,04		
14/12/88	7746	Baeckeroot	Acétate de sodium kg	1	186,20		
14/12/88	7746	Baeckeroot	Tris(hydroxyméthyl) aminométhane 500 g	1	423,36		
14/12/88	7008016	Anarex	manioc camerounais kg	29	522,00		
8/12/88	7	Laborama	Toluène 1	1	79,10		
8/12/88	9	Laborama	Pyridine 1	1	237,75		
8/12/88	9	Laborama	spatule	1	32,00		
12/12/88	30491	Labover	Ammonium dihydrogénophosphate kg	10		1719,50	
12/12/88	30491	Labover	sac de 1000 cônes jaunes (P200)	20		2470,00	
12/12/88	30491	Labover	sac de 1000 cônes bleus (P1000)	20		2470,00	
12/12/88	30491	Labover	boîte de 50 plaques gel de silice 60	8		4894,40	
12/12/88	30491	Labover	échange standard déminéraliseur	2		1592,20	
12/12/88	30491	Labover	fiolle jaugée 1000 ml	10		905,16	
12/12/88	30491	Labover	hexane 5 l	4		524,40	
12/12/88	30491	Labover	boîte de 200 capillaires et pistons (M25)	4		950,00	
12/12/88	30491	Labover	Agarose type II 100 g	4		3340,00	
12/12/88	30491	Labover	Pistolet pulvérisateur à buses téflon	1		159,50	
28/12/88	7910	Baeckeroot	Glucose Oxydase 10000 U	2	153,27		
28/12/88	7910	Baeckeroot	ABTS Boehringer 2g	2	342,02		
23/12/88	7857	Baeckeroot	Glucose oxydase 50000 U	1	249,12		
13/12/88	4461451	Ducros	transport manioc	1	164,00		
28/12/88	867343	OSI	tamis 0,100	1	234,00		
28/12/88	867343	OSI	tamis 0,300	1	274,00		
28/12/88	867343	OSI	tamis 0,500	1	284,00		
17/1/89	871474	OSI	tamis 0,710	1	284,00		
17/1/89	871474	OSI	fond	1	257,00		
31/1/89	3275	Laborama	Boîte de 100 cuves jetables pour spectro	2	47,30		
10/2/89	8167	Baeckeroot	Amyloglucosidase 100 U/mg 5g	1	398,86		
10/2/89	8167	Baeckeroot	Linamarase 50 EU	2	831,04		
10/2/89	N.2.		Indemnités de stage (Nadine Zakhia)	3	9237,65		
		magasin CIRAD	sachet de 4000 cupules 2 ml à fond plat	1	141,40		
31/1/89	3275	Laborama	toluène qualité ordinaire 5l	1	85,15		
7/2/89	875116	OSI	Agar DIFCO	7		3725,12	
7/2/89	875116	OSI	Tryptone	4		1519,20	
8/2/89	4461513	Ducros	Transport de manioc	1	242,30		
24/3/89	D.S.		Indemnités de stage (Didier Stella)	3	3000,00		
31/3/89	12459	GEO Voyage	billet Montpellier-Paris (Glikou Ekué)	1	383,00		
10/8/89	9443	Baeckeroot	linamarase 50 EU	2	1074,08		
3/4/89	G.E.		indemnités de stage (Glikou Ekué)		7000,00		
30/5/89	3306 PR	Laborama	dispenser 10 (occasion)	1	554,60		
30/5/89	3306 PR	Laborama	ampoules tampon pH (pH5, pH6, pH10)	3	289,75		
28/6/89	66412	Mesurix	thermometre portable PN6	1			980,00
28/6/89	66412	Mesurix	capteur thermocouple LM6K	1			680,00
14/6/89	905063	OSI	tamis Ø198mm h=55mm	5			1396,50
14/6/89	905063	OSI	fond Ø198mm	1			117,80
14/6/89	905063	OSI	couvercle Ø198mm	1			93,10
9/6/89	9013	Baeckeroot	ampoule tampon pH (4, 5, 7)	18			1323,00
9/6/89	9013	Baeckeroot	rouleau de papier pH (2.5-4.5 et 4-7)	6			332,22
23/5/89	35851	Labover	échange standard déminéraliseur	2		1685,30	
23/5/89	35851	Labover	fiolle conique pyrex 'col étroit' 100 ml	25		322,28	
23/5/89	35851	Labover	tube UV 15 W 312 nm	6		1057,92	
23/5/89	35851	Labover	100 boîtes de Pétri stériles Ø100	30		1385,10	
23/5/89	35851	Labover	1000 cones jaunes Gilson	14		1729,00	
23/5/89	35851	Labover	fiolle conique pyrex 'col étroit' 1000 ml	10		307,30	
23/5/89	35851	Labover	bague raccord pour GL 45	1		34,54	
19/6/89	9065	Baeckeroot	Glucose oxydase Sigma G6125 50000 U	1	267,00		
21/6/89	907031	OSI	paires de Tridigants A72 270 08	7	396,90		
21/6/89	907031	OSI	flacon verre Duran 50 A10 144 28	6	437,40		

21/6/89	907031	OSI	sachets de 1000 cônes 1000V A18 513 01	2	255,60	
21/6/89	907031	OSI	sachets de 1000 cônes 20V A18 513 02	1	127,80	
17/6/89	9131	Baeckeroot	ampoule tampon pH 2, 3, 8, 9, 12 et 13	6	501,00	
28/6/89	OM47	M.J.	Frais de mission au Togo (Michel Jory)		3320,80	
21/6/89	110/89	GIE-Agriforce	accouplement pour groupe électrogène	1		920,00
27/7/89	9408	Baeckeroot	Glucose oxydase Sigma G6125 50000 U	1	261,66	
27/7/89	9408	Baeckeroot	Péroxydase Sigma P8125 50000 U	1	298,21	
27/7/89	9408	Baeckeroot	Tris Merck 8382 500g	1	500,78	
27/7/89	9408	Baeckeroot	Sulfate de sodium anh Labosi J1665 1kg	1	91,63	
27/7/89	9408	Baeckeroot	Amidon Merck1252 250g	1	116,62	
1/8/89	8613/5756	Madec Mater	gicleur Ø3,5mm pour brûleurs série 610	4		292,00
30/6/89	14626069	AGEI	presse-étoupe	11	10,98	
30/6/89	14626069	AGEI	boîtier 'arrêt d'urgence'	1	86,39	
16/2/90	43403	Labover	lames 76 x 26 mm ordinaires (1000)	20		221,20
16/2/90	43403	Labover	Saccharose D (+) R.P. P.A. 1kg	12		1240,32
16/2/90	43403	Labover	Acide Nitrique 52,5% P.A. 1l	12		930,24
16/2/90	43403	Labover	Lactose Rect. 1 H2O 1kg	6		488,52
16/2/90	43403	Labover	Amidon soluble 1kg	10		2128,00
16/2/90	43403	Labover	Thermometre numerique AEM 1100	2		1044,94
16/2/90	43403	Labover	Pipetman Gilson p 1000	2		2004,50
16/2/90	43403	Labover	Pipetman Gilson p 5000	2		2413,00
16/2/90	43403	Labover	cônes jaunes pour pipetman (1000)	15		1852,50
16/2/90	43403	Labover	Cônes bleus pour pipetman (1000)	10		1235,00
16/2/90	43403	Labover	Potassium carbonate (200g)	8		744,80
13/6/90	30890	Labover	Nitrate d'argent RP PA (100g)	1		762,04
13/6/90	30890	Labover	Appareil filtration sous vide s/Reser.	4		1318,60
13/6/90	30890	Labover	Cônes bleus Gilson pour pipetman (1000)	15		1852,50
13/6/90	30890	Labover	Cônes jaunes Gilson pour pipetman (1000)	15		1852,50
13/6/90	30890	Labover	Ethanol amine Rectapur (1 l)	12		1972,20
13/6/90	30890	Labover	Seringues Cornwall de rechange 5ML	6		316,96
13/6/90	30890	Labover	Echanges standard de résine, inox 60 L	4		3944,40
13/6/90	30890	Labover	Lactose rect. 1 H2O (1 kg)	12		977,04
13/6/90	30890	Labover	Acide acétique 80% (5 l)	12		803,76
31/7/90		A.M.	Indemnités de stage (Adadé Mivédor)	1,3	1900,00	
21/10/90		A.M.	Indemnités de stage (Adadé Mivédor)	2,7	3900,00	
		A.M.	cantine (Adadé Mivédor)	84	1008,00	
30/6/90		A.M.	transport Le Havre-Montpellier (Adadé Mivédor)	1	460,00	
31/5/90	2116250	SHR	pommes de terre	100	290,00	
14/6/90	992852	OSI	tuyaux technicon 0.10, 0.23 et 0.32 ml/min	12	246,00	
21/6/90	8019590	Anarex	manioc parafiné 'Costa-Rica'	100	1250,25	
10/7/90	12112	Baeckeroot	Linamarine BioChemical 40070	2	638,80	
10/7/90	12112	Baeckeroot	Acide phosphorique 85% 406002	1	96,92	
21/6/90	4461861	Ducros	Transport de 100kg de manioc	1	336,94	
5/8/90	5093	OSI	Sachet Anaerocult A (paquet de 10) Merck 1382	1	89,28	
5/8/90	5093	OSI	MRS agar (500g) Merck 10660	1	343,17	
5/8/90	5093	OSI	YGC agar (500g) Merck 16000	1	244,12	
5/8/90	5093	OSI	milieu vitaminé (100g) DIFCO A5 0335-15	1	439,00	
5/8/90	5093	OSI	Boîtes de Pétri Ø90 steriles (600)	1	261,90	
5/8/90	5093	OSI	Support pour 24 tubes à essais Ø21	3	224,10	
5/8/90	5093	OSI	Coton cardé (500g)	2	77,76	
30/9/90	6955	Supelco	Seringue Hamilton 1750 TTL 0,5 ml	1	300,00	
		Baeckeroot	Linamarase 50 EU	3	1500,00	
12/9/90	49150	Labover	Parafilm 0,10x38M	12		1365,72
12/9/90	49150	Labover	Echange standard résine inox 60L	3		2958,30
12/9/90	49150	Labover	Glucose D(+) anhydre 1 kg	10		1219,80
12/9/90	49150	Labover	Calcium hypochlorite 70% 1 kg	10		1197,00
12/9/90	49150	Labover	Rhamnose 25 g	6		3659,40
12/9/90	49150	Labover	Ribose 25 g	4		1489,60
12/9/90	49150	Labover	Adonisol 10 g	4		1360,40
12/9/90	49150	Labover	Tréhalose 10 g	4		1265,40
12/9/90	49150	Labover	Cuve à UV micro 1 ml (boîte de 100)	13		485,55
31/8/90	12455	Baeckeroot	Acide barbiturique PA 100 g	1	367,50	
1/10/90	9002325	Anarex	manioc Costa-Rica	68,4	890,33	
13/9/90	12510	Baeckeroot	Acide barbiturique 250g	1	142,10	
		Ducros	Transport de 70 kg de manioc		263,80	